



João Gonçalves Pêcego

Licenciado em Ciências de Engenharia
Química e Bioquímica

**Implementação do Método Laboratorial
de Determinação do Teor de Clorofila
em Óleos Vegetais e Otimização do
Processo de Refinação para a sua
Remoção**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Marina Reis, Mestre, Sovena Oilseeds Portugal
Co-Orientador: Pedro Simões, Professor Doutor, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio
Arguente: Doutor Alexandre Babo de Almeida
Vogal: Engenheira Sandra Marina Reis de Couto Ferreira



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro de 2014

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Do aluno

João Gonçalves Pêcego

Nº 28598

Licenciado em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

Do Mestrado Integrado em Engenharia Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências e
Tecnologias – Universidade Nova de Lisboa

Implementação do Método Laboratorial de Determinação do Teor de Clorofila em Óleos
Vegetais e Otimização do Processo de Refinação para a sua Remoção

Orientador: Marina Reis, Engenheira, Grupo Sovena
Coorientador: Pedro Simões, Professor Doutor, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professor Soutor Mário Eusébio Fernando José Eusébio
Arguente: Doutor Alexandre Babo de Almeida
Vogal: Engenheira Sandra Marina Reis de Couto Ferreira

Outubro de 2014

Copyright

Implementação do Método Laboratorial de Determinação do Teor de Clorofila em Óleos Vegetais e Otimização do Processo de Refinação para a sua Remoção

Copyright © João Gonçalves Pêcego, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos produzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

À Engenheira Marina, um agradecimento especial, pelo apoio, pela paciência, pela disponibilidade e pela simpatia demonstradas durante todo o estágio, bem como pelo facto de ter confiado em mim para a realização deste projeto.

À Direção da Sovena agradeço por permitirem e ajudarem a que alunos possam realizar estes trabalhos numa empresa de grande dimensão e reconhecimento.

Ao Professor Doutor Pedro Simões por toda a orientação dada durante este trabalho.

Ao Professor Doutor Pedro Lima e à Doutora Helena Lopes agradeço a dedicação e entusiasmo com que transmitiu todo o conhecimento científico e se disponibilizou para ajudar quando necessário.

A todos os colaboradores da empresa pela forma como me receberam e me trataram, pelo companheirismo e amizade demonstrados, e por todo o apoio prestado, um agradecimento particular ao Engenheiro Hugo Carapinha e à Engenheira Tânia Pascoalinho por todo o conhecimento, paciência e ajuda prestados, que permitiram diversas melhorias, quer durante o estágio quer no resultado final deste projeto.

A todos os meus amigos que acompanharam o projeto e ouviram pacientemente os aspetos positivos e negativos de todo o projeto, em especial ao David Sousa, Tatiana Duarte, Tiago Costa, Nádia Carmo e João Sequeira que contribuíram com o seu conhecimento e opinião.

À minha família pelo apoio, ajuda e interesse durante o período de realização da tese, e principalmente por terem acompanhado e tornado possível todo o meu desenvolvimento escolar, que sem eles não seria possível.

Resumo

A clorofila é considerada, para além de um parâmetro indicador do sucesso (ou insucesso) do branqueamento do óleo vegetal, um composto prejudicial quer na avaliação final da cor do óleo vegetal refinado quer na estabilidade oxidativa do produto final. Assim, neste projeto, foi recriada essa mesma etapa em laboratório, tendo em vista a otimização das condições de trabalho que mais influenciam a remoção de clorofila.

A medição dos níveis de clorofila é feita através de espectrofotoscopia UV/VIS em óleos vegetais. Devido a tal facto, inicialmente foram comparados entre si três métodos (AOCS Cc13d-55, AOCS Cc13i-96 e BFM 0a-8) usados na determinação da clorofila, de entre os quais se encontra o utilizado na empresa atualmente. Os resultados mostraram que o método mais fiável era o BFM 0a-8, sendo contudo necessário ajuste e validação do método.

Foi realizada também a validação através de Análise Estatística – Seletividade; Linearidade na gama de trabalho estudada (0,25ppm a 40ppm); Precisão e Exatidão apresentando ambos resultados positivos; Limites de Detecção e Quantificação que foram definidos em 33ppb e 106ppb, respetivamente; Estabilidade, Gama e Robustez. Para tal foi usado um espectrofotómetro Hitachi modelo U-2800 para obtenção de absorvâncias, em comprimentos de ondas previamente fixados (630nm, 662nm, 668nm, 670nm, 672nm e 710nm), com as quais são calculados os valores da clorofila. Desta forma, e avaliando os parâmetros descritos anteriormente pode-se concluir que o método é seletivo e linear, respeitando a equação $Abs = 0,000058 \cdot [Clorofila]$ com $r^2 = 0,9966$, possuindo ainda uma boa precisão e exatidão.

Foram depois iniciados os ensaios de otimização do branqueamento na refinação de óleos vegetais. Os fatores considerados nesta melhoria foram: o tempo de contacto entre as terras de branqueamento e o óleo; a quantidade de terras de branqueamento adicionadas; a temperatura de branqueamento, a percentagem de óleo a ser usado para adição das terras e a temperatura de adição das terras de branqueamento a este caudal secundário. Os ensaios de tempo de contacto foram efetuados a 20, 45 e 60 minutos sendo que a maior quantidade de clorofila removida foi observada a 60 minutos. As diferentes quantidades de terras de branqueamento adicionadas permitiram observar que a maior adição de terras de branqueamento origina uma maior remoção de clorofila. Tal como os ensaios da quantidade das terras de branqueamento, o aumento da temperatura de branqueamento permite o aumento da remoção de clorofila de forma constante. Por fim, relativamente ao caudal de hidratação, foi possível concluir que a sua variação não influencia a remoção de clorofila e, em termos da temperatura deste mesmo caudal não foi possível obter qualquer tipo de conclusão perante os resultados obtidos.

Palavras-Chave: óleo vegetal; branqueamento; refinação química; remoção clorofila

Abstract

Chlorophyll is considered, in addition to a parameter indicator of the success (or failure) of the bleaching vegetable oil, a harmful compound in the final evaluation of the color of refined vegetable oil and the oxidative stability of the final product. Thus, in this project, it was recreated this same stage in the laboratory, aiming the optimization of the working conditions that mostly influence the removal of chlorophyll.

The measurement of chlorophyll is performed by spectroscopy UV/VIS in vegetable soybean oil. Due to this fact, initially were compared three methods (AOCS Cc13d-55, AOCS Cc13i-96 and BFM-8 0a) in the determination of chlorophyll within which the one currently used in the company. The results showed that the most reliable method was BFM0a-8, but further adjustment of the slope.

Validation was also performed through the respective Statistical Analysis – Selectivity; Linearity in the working range (0,25ppm to 40ppm); Precision and Accuracy presenting both positive results; Limits of Detection and Quantification were set at 33ppb and 106ppb, respectively; Stability, Range and Robustness. For this we used a spectrophotometer Hitachi model U-2800 to obtain absorbances at wavelengths set in advance (630nm, 662nm, 668nm, 670nm, 672nm and 710nm), with which the chlorophyll values were calculated. This way, evaluating the parameters described above it was concluded that the method is selective, linear, respecting $Abs=0.000058 \cdot [chlorophyll]$ with $r^2=0.9966$, has good precision and accuracy. The LD and LQ was 33,036 ppb and 106.2 ppb, respectively, and the stability of the samples over 72 hours are satisfactory.

After the validation of the quantification method, tests to optimize the bleaching step in the refining of vegetable oils were initiated. The factors considered relevant in this improvement were: contact time between bleaching earths and the oil, the amount of bleaching earths added, the bleaching's temperature, the percentage of oil that is used for addition of earths and the temperature of addition of bleaching earths to this secondary flow. Regarding the contact time trials at 20, 45 and 60 minutes, the largest amount of removed chlorophyll was observed at 60 minutes were made. The different amounts of bleaching earths added allowed to observe that the biggest addition of bleaching earths removal leads to a linear positive slope. Similarly to the trials of the quantity of bleaching earth, the temperature increase of bleaching allows for increased removal of chlorophyll almost linearly. Finally, compared to the flow rate of hydration was concluded that the variation of the quantity of flow does not influence the removal of chlorophyll and in terms of the temperature of that flow has not been possible to obtain any defined correlation.

Keywords: vegetable oil; bleaching; chemical refining; chlorophyll removal

Lista de Acrónimos

AOCS – American Oil Chemists' Society

CUF – Companhia União Fabril

FFA – Free Fatty Acids

PET – Politereftalato de etileno

ppb – partes por bilião

ppm – partes por milhão

UV – Ultravioleta

VIS – Visível

Índice

I – Introdução	1
II – Razões para a Elaboração deste Estudo	4
III – Grupo Sovena	5
III.1 - História do Grupo Sovena	5
III.2 - História da Sovena Oilseeds	6
IV - Refinação do Óleo de Soja e Colza	7
IV.1 - Importância de Refinação de Óleos Vegetais	7
IV.2 - Refinação Química ou Física?	8
IV.3 - Refinação Química	9
IV.3.1 - Desgomagem e Neutralização (<i>Degumming and Neutralisation</i>)	9
IV.3.2 – Lavagem (Washing)	12
IV.3.3 – Branqueamento (<i>Bleaching</i>)	12
IV.3.4 – Desodorização (<i>Desodorization</i>)	13
V – Etapa de Branqueamento	15
V.1 – Adsorventes	15
V.2 - Adsorção e Isotérmicas de adsorção	19
V.3 - Parâmetros do Branqueamento	20
V.3.1 - Dosagem das Terras de Branqueamento	20
V.3.2 – Temperatura	21
V.3.3 - Tempo de Residência	22
V.3.4 – Humidade	22
V.4 – Filtração	22
V.5 – Pigmentos	23
V.5.1 – Clorofila	24
VI – Espectroscopia	27
VI.1 – Espectrofotometria	27
VI.1.1 – Instrumentação	29
VI.2 – Métodos para Determinação da Concentração de Clorofila	31
VI.3 – Validação do Método	33
VI.3.1 - Características de Desempenho	35
VI.3.5 - Limites de Detecção e Quantificação	41
VI.4 – Lovibond	44
VII - Materiais e Métodos	45
VII.1 – Espectroscopia / Comparação dos Métodos de Quantificação de Clorofila	45

VII.1.1 – Material	45
VII.1.2 – Método de Preparação da Soluções Padrão	45
VII.1.3 – Obtenção das Absorvâncias	46
VII.2 – Espectroscopia / Validação do Método	46
VII.2.1 – Material Utilizado.....	46
VII.2.2 – Método de Preparação das Soluções-Padrão	46
VII.2.4 – Obtenção das Absorvâncias	47
VII.2.3 – Obtenção das Amostras de Óleo.....	47
VII.3 – Ensaio de Branqueamento	47
VII.3.1 – Material Utilizado.....	47
VII.3.1 – Obtenção de óleo de Lavado	48
VII.3.2 – Obtenção das Terras de Branqueamento	48
VII.3.4 – Método Utilizado	48
VII.3.5 – Análises Laboratoriais	49
VIII – Apresentação e Discussão de Resultados	50
VIII.1 – Análise do Método de Determinação de Clorofila.....	50
VIII.2 – Validação do Método	51
VIII.2.1 – Linearidade da Curva de Calibração do espectrofotómetro para medição da clorofila.....	51
VIII.2.2 – Precisão	52
VIII.2.3 – Exatidão.....	53
VIII.2.4 – Limites de Detecção e Quantificação	54
VIII.2.5 – Estabilidade.....	54
VIII.3 – Ensaio de Branqueamento	55
VIII.3.1 – Tempo de Contacto.....	55
VIII.3.2 – Temperatura de Trabalho	56
VIII.3.3 – Quantidade de Terras de Branqueamento Adicionadas.....	57
VIII.3.4 – Percentagem de Caudal de Óleo para adição das terras de branqueamento	58
VIII.3.5 – Variação da temperatura do Caudal de Hidratação	59
VIII.4 – Lovibond.....	60
IX - Conclusão	62
X - Bibliografia	63
XI - Anexos.....	66

Índice de Figuras

Figura 4.1 - Esquema Geral da Refinação Química	9
Figura 4.2 - Reação de Desgomagem Química.....	10
Figura 4.3 - Reacção de Saponificação dos Ácidos Gordos Não Esterificados.....	11
Figura 5.1- Nível de ativação necessário dependendo do composto a remover	17
Figura 5.2 - Isotérmicas de adsorção mais comuns	20
Figura 5.3 - Representação do Princípio base do <i>Precoating</i>	23
Figura 5.4 - Clorofila a e b	25
Figura 5.5 - Esquema de Degradação da Clorofila	26
Figura 6.1 - Representação Esquemática do Espectro Eletromagnético	27
Figura 6.2 - Representação da Relação entre Transmissão e Absorção	28
Figura 6.3 - Espectro de Absorção da clorofila.....	29
Figura 6.4 - Espectrofotómetro usado no laboratório	30
Figura 6.5 - Esquema da Instrumentação necessária a um espectrofotómetro	31
Figura 7.1 - Aparato Experimental	49
Figura 8.1 – Correlação da absorvância da clorofila	51
Figura 8.2 - Efeito do tempo de contacto óleo/terras, na concentração de clorofila	56
Figura 8.3 - Efeito da Variação da Temperatura de Trabalho, na concentração de clorofila	57
Figura 8.4 - Efeito da variação da quantidade de terras de branqueamento, na concentração de clorofila.....	58
Figura 8.5 - Ensaio envolvendo alteração da percentagem de caudal de hidratação.....	59
Figura 8.6 - Novo equipamento, Lovibond.....	61

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Produção Mundial dos Principais Óleos Vegetais	1
Tabela 4.1 - Constituintes do Óleo de Soja e Colza (Przybylski, 2014).....	7
Tabela 8.1 - Médias dos diversos métodos de quantificação da clorofila para comparação	50
Tabela 8.2 - Exatidão	53
Tabela 8.3 - Média e Desvio Padrão do conjunto de brancos para cálculo do LQ e LD	54
Tabela 8.4 - Dados da Estabilidade ao longo do tempo de dois lotes distintos (911 e 912) de Óleo Cru de Soja	54
Tabela 8.5 - Dados de Estabilidade ao longo do tempo para Óleo Refinado.....	54
Tabela 8.6 - Valores Lovibond e sua diferença relativa ao espectrofotômetro.....	60
Tabela 11.1 - Resultados do Método Cc 13i-96 de cada ensaio	73
Tabela 11.2 - Resultados do Método BFM 0a-8 para cada um dos Ensaio	73
Tabela 11.3 - Resultados do Método utilizado na Sovena, para cada um dos Ensaio	74
Tabela 11.4 - Dados Clorofila para Obtenção do Gráfico "Linearidade"	74

I – Introdução

Um óleo vegetal é um triglicérido, que apesar de poder ser extraído de diversas partes de uma planta, é comercialmente extraído das sementes. O termo “óleo vegetal” pode ser usado quando nos referimos a substâncias que são líquidas à temperatura ambiente, ou de forma mais geral, sem ter em conta o estado da substância a uma dada temperatura. Por esta razão, os óleos vegetais que são sólidos à temperatura ambiente são, por vezes, chamados de gorduras vegetais (Anónimo, 2013).

Tendo em foco o óleo vegetal alimentar, este é produzido mundialmente e tem tido um crescimento contínuo desde 1995, quase triplicando o seu consumo desde essa data. Contudo, este óleo não possui uma fonte única, sendo as principais sementes usadas para a produção de óleo vegetal, as de Palma, Soja, Colza e Girassol (Statista, s.d.). Em termos de produção global destes mesmos óleos, de acordo com a USDA, em 2014, a mesma pode ser observada, na tabela seguinte:

Tabela 1.1 - Produção Mundial dos Principais Óleos Vegetais (USDA, 2014)

Óleo	Quantidade (Milhões de toneladas)
Palma	62,84
Soja	46,75
Canola	26,20
Girassol	15,40

O processo de produção de óleos vegetais inicia-se, antes de mais, na extração do óleo das sementes da planta. Isto pode ser feito via extração mecânica ou por extração química usando um solvente adequado. O óleo extraído pode então ser purificado e, se necessário, refinado ou quimicamente alterado (Anónimo, 2013). Contudo, é comum haver a combinação dos dois tipos de extração, química e física, de forma a maximizar o rendimento total de extração de óleo. (Andreson, 2005)

A extração mecânica, denominada “esmagamento” ou “compressão”, é tipicamente usada para produzir óleos mais tradicionais como azeite ou óleo de coco. Existem diversos tipos de extração mecânica: extração por *expeller-pressing* é a mais comum, contudo *screw press* e *Ghani* (estilo almofariz) são também usados (Anónimo, 2013).

A extração de óleo vegetal para aplicações comerciais é geralmente feita utilizando extração por solventes, pois tem maiores rendimentos, sendo mais rápida e com menores custos. O solvente mais utilizado nesta prática é o hexano. Esta técnica é usada para óleos industriais mais recentes como a soja ou o de milho. Como alternativa, pode ser usado dióxido de carbono supercrítico por não ser tóxico (Anónimo, 2013).

Apesar de a extração do óleo das sementes ser uma parte essencial do processo de produção de óleos vegetais para consumo humano, o óleo não pode ir diretamente para a mesa do consumidor. Sendo a Sovena Oilseeds S.A. uma empresa alimentar, está sujeita a fortes e inúmeras restrições nos mais diversos parâmetros relativos ao óleo refinado, incluindo análise à cor vermelha e amarela, sabor e cheiro. Para além da preocupação legal, a intenção de fabricar um produto final de qualidade superior e, ao mesmo tempo reduzir os custos, está sempre presente, de forma a melhorar o máximo possível.

A grande maioria dos óleos crus e gorduras consistem em mais de 95% de uma mistura de triacilgliceróis. A fração de não-triacilgliceróis contém quantidades variáveis de fosfatídeos, FFA, produtos de oxidação, matéria não-saponificável (tocofenóis, esteróis, hidrocarbonetos, pigmentos e vitaminas) e outras impurezas. As quantidades destes componentes no óleo cru variam com a fonte, processo de extração, estação do ano e origem geográfica. O objetivo da refinação é remover estes componentes que têm um efeito adverso na qualidade do óleo com o mínimo de degradação dos triacilgliceróis (Karasulu, et al., 2011).

O processo usado na Sovena Oilseeds é conhecido como Refinação Química ou Cáustica - constituída por quatro etapas principais: Desgomagem/Neutralização, Lavagem, Branqueamento e Desodorização. Cada uma destas etapas tem um papel específico na remoção e/ou estabilização de compostos presentes no óleo vegetal (Christenson, 1983), assunto que será posteriormente aprofundado neste documento. Para além disso é necessário ter em atenção o facto de o óleo ser apresentado ao consumidor em garrafas PET (transparentes), tornando claro que a etapa de branqueamento, ou seja, a remoção da cor do óleo, que é uma etapa importante, sendo responsável por eliminar as substâncias que conferem cor inadequada e instabilidade ao produto final.

Um dos pigmentos removidos no branqueamento e sob o qual irá incidir grande parte da atenção deste projeto é o pigmento denominado clorofila. Este é um pigmento verde fotossintético, encontrado em plantas, responsável pela captação de energia luminosa, podendo, por isso, intensificar o fenómeno de fotooxidação nos óleos vegetais (Batinas, 2006). Existem diversos tipos de clorofila denominados de *a*, *b*, *c1*, *c2* e *d*, sendo que a estrutura da clorofila *c1* e *c2* difere bastante das restantes. Neste projeto serão tratados com maior detalhe os tipos de clorofila *a* e *b*, pois são os únicos que se encontram naturalmente em plantas e sementes de soja e colza.

Para a deteção e quantificação da clorofila em óleos vegetais é usada análise por espectroscopia UV/VIS por ser um método simples e de baixo custo. Contudo, será necessária a sua validação de forma a assegurar um método adequado à identificação e quantificação do parâmetro em questão. Para tal, serão analisadas as seguintes características de desempenho do método: linearidade, seletividade, limites de deteção e quantificação, precisão, exatidão e a gama de trabalho. Para além da validação do método já implementado na empresa, será também analisado o desempenho do novo equipamento adquirido pela empresa para medição da clorofila, o Lovibond Série PFX995/950.

Para a realização deste projeto serão também avaliados os parâmetros que maior influência têm no branqueamento e consequentemente na remoção da clorofila: tempo de contacto, temperatura de trabalho, quantidade de terras, percentagem de caudal retirado para adição de terras e variação da temperatura deste mesmo caudal; de forma a otimizar o processo, compreender como o mesmo se processa e melhorar a qualidade do produto final.

II – Razões para a Elaboração deste Estudo

A etapa de branqueamento na refinação de óleos vegetais é necessária para remoção de compostos específicos, que poderão causar perda de qualidade do produto final, sendo para tal adicionadas ao óleo terras de branqueamento.

Esta etapa é especialmente importante pois:

- Permite alcançar óleo refinado de elevada qualidade;
- Possui grande importância na avaliação da viabilidade económica de todo o processo, devido ao custo das terras e perda de óleo nesta etapa.

Contudo, apesar de a clorofila ser apenas uma das impurezas removidas na etapa do branqueamento, a otimização da sua extração é necessária por: conceder uma cor verde ao óleo, poder afetar de forma negativa a análise da cor vermelha¹, se decompor sob pH ácido e na presença de oxigénio, e ter um impacto significativo na estabilidade oxidativa do óleo.

Houve portanto a necessidade de validar o método de quantificação da clorofila em óleos vegetais implementado no laboratório, visto a última avaliação ter sido feita há mais de dez anos; e de otimizar, dentro do possível, a remoção de clorofila na fase de branqueamento de óleos vegetais. Assim, a otimização deverá ser realizada em laboratório e em caso de sucesso deverá então haver uma análise de custo-benefício da implementação do método otimizado na produção, de forma a melhorar todo o processo.

Espera-se que este estudo forneça diversos benefícios como: a confirmação laboratorial de que a quantificação da clorofila está a ser devidamente feita; redução de custos, se for viável a implementação de alguma melhoria no processo; e a investigação e revisão de bibliografia relativamente à refinação de óleos vegetais para aplicação alimentar que poderá contribuir para a descoberta de avanços tecnológicos eventualmente podendo beneficiar a Sovena.

¹As xantofilas são uma substância de tonalidade acastanhada escura e produto da oxidação do caroteno que conferem a cor vermelha, em óleos vegetais. (Thurman, 1932)

III – Grupo Sovena

III.1 - História do Grupo Sovena

A CUF, criada nos finais século XIX, era já o maior grupo português no início do século XX, com um complexo industrial no Barreiro e uma enorme abrangência de negócio, desde a construção naval até aos óleos alimentares passando pelos adubos, têxteis e ácidos. A Sovena viria a ser criada, em 1956, numa parceria entre a CUF, a Macedo e Coelho e a Sociedade Nacional de Sabões, para comercialização de óleos vegetais e sabões. (Santos, 2012)

Contudo, em 1974, a instabilidade social e política causada pelo fim da ditadura em Portugal desintegraram a CUF. (Santos, 2012)

Com o regresso da estabilidade o grupo foi reconstruído começando pela aquisição da Sociedade ALCO em 1982, cuja área de negócio era a extração, pré-tratamento e embalamento de óleos alimentares, adquirindo de seguida a Fábrica Torrejana de Azeites em 1985. Na década de 90, com o objetivo de reforçar a posição do grupo no mercado de óleos e azeites, seguiram-se as aquisições da LUSOL (extração e pré-tratamento de óleos e produção de sabões) e da TAGOL (extração e pré-tratamento de oleaginosas e soja). (Santos, 2012)

O início do século XXI ficou marcado pela reestruturação através da concentração das atividades de extração na antiga TAGOL e de embalamento na SOVENA *Good Consumers*, e de uma nova vaga de aquisições devido à necessidade crescente de responder a um mercado mundial. (Santos, 2012)

Estando já em primeiro lugar na Península Ibérica no ano de 2002, o Grupo decidiu expandir-se para o Brasil, adquirindo assim novos ativos, em 2004, com a intenção de relançar a marca Andorinha no mercado Brasileiro. Seguiu-se, em 2005, a aquisição de 80% do capital do maior importador e embalador de azeite nos EUA. (Santos, 2012)

Atualmente com uma forte presença em três continentes, iniciou a criação de negócios em Marrocos, a Soprolives; em parceria com a Bunge, constituiu a Biocolza, cuja principal atividade consiste é a extração de semente de colza e comercialização de produtos daí resultantes; e adquiriu também 80% do capital da Exoliva, empresa dedicada à preparação e embalamento de azeitonas essencialmente para exportação e com uma posição relevante nos mercados Russo, Ucrainiano e Médio Oriente. (Santos, 2012)

Em 2007, na Tunísia, foi criada a Sovena MENA (Midle East & North Africa) para abastecer o mercado tunisino e países vizinhos; e foi constituída a Agrodiesel, uma parceria com a Diester, cuja fábrica foi instalada junto da fábrica da Tagol tendo iniciado operação no mesmo ano. (Santos, 2012)

O ano de 2008 foi marcado pela reestruturação e unificação do grupo, passando a denominar-se Sovena Group, com quatro unidades de negócio distintas: Biodiesel, Agricultura, Oilseeds e *Consumer Goods*. (Santos, 2012)

O Grupo Sovena é agora o segundo operador mundial de azeites, fisicamente presente em sete países – Portugal, Espanha, EUA, Brasil, Angola, Tunísia e Marrocos – e com exportações para mais de 70 países. O Grupo dá emprego, em todo o mundo, a mais de mil colaboradores. (Santos, 2012)

III.2 - História da Sovena Oilseeds

A atual Sovena Oilseeds Portugal, S.A., teve início em 1973 por Fábricas Mendes Godinho S.A., como Tagol, com o intuito de desenvolver o negócio do fornecimento de matérias-primas à indústria de alimentos compostos para animais. (Santos, 2012)

Em 1975, iniciou o funcionamento a primeira fábrica de extração (Fábrica 1) que conseguia processar até 400 toneladas de sementes de soja por dia. Neste período os navios eram descarregados no meio do rio para batelões e posteriormente descarregados para o cais da Tagol. Por isso, em 1979, foi construído o silo portuário e ponto provisório de acostagem de navios, tornando sendo assim possível descarregar os navios graneleiros diretamente para as instalações. (Santos, 2012)

Em 1981, entrou em funcionamento a segunda fábrica de extração (Fábrica 2) com processamento de 1500 toneladas de sementes de soja por dia. Com a instalação desta fábrica também foi elevada a capacidade de armazenamento de matéria-prima em 13500 toneladas, de óleo em 8000 toneladas e de farinha em 5000 toneladas. Em 1983 e 1987, foram feitas remodelações que permitiram um aumento da capacidade de processamento para 800 toneladas por dia. E em 1988 arrancou a refinação de óleos vegetais, (Santos, 2012)

No início do século XXI, a Sovena Oilseeds sofreu uma remodelação profunda. A Fábrica 1 ficou somente dedicada à extração de óleo de girassol com uma capacidade de 800 toneladas de semente por dia, entrou em funcionamento uma linha dedicada à produção de farinha de soja, com capacidade de 250 toneladas por dia, a capacidade de pré-tratamento foi aumentada de 150 para 220 toneladas por dia e a extração de girassol foi adaptada para extrair colza. (Santos, 2012)

Em 2007, surgiu a aposta numa área não alimentar – o Biodiesel – com uma capacidade de fabrico diária de 300 toneladas. E em 2012 a nova Extração de Girassol e Colza. (Santos, 2012)

A Sovena Oilseeds Portugal atualmente está vocacionada para o fornecimento de matérias-primas para fábricas de rações e produção de óleos vegetais de soja, colza e girassol, crus ou refinados para alimentação humana. (Santos, 2012)

IV - Refinação do Óleo de Soja e Colza

IV.1 - Importância de Refinação de Óleos Vegetais

Todas as gorduras e óleos crus obtidos através de trituração e extração de sementes contêm inevitavelmente quantidade apreciáveis de outros componentes para além dos triglicéridos, como ácidos gordos, mono- e diglicerídeos, fosfatídeos, hidrocarbonetos, pigmentos, vitaminas, glicolípidos, fragmentos proteicos, pesticidas e vestígios de metais. As quantidades variam consoante as matérias-primas, processo de extração, estação do ano e geografia do local de produção da matéria-prima. Por isso, remover totalmente ou para valores aceitáveis estes componentes, sem perdas na qualidade do produto final e de forma económica viável, é o objetivo principal da Refinação de Óleos Vegetais (O'Brien, 2009).

Para os óleos tratados neste projeto, Óleo de Soja e de Colza, pode ser apresentada de forma geral a Tabela 4.1 que possui os principais constituintes destes óleos e as respetivas concentrações:

Tabela 4.1 - Constituintes do Óleo de Soja e Colza (Przybylski, 2014)

Componente	Soja	Colza
Triglicéridos (%)	93,0 – 99,2	91,8 – 99,0
Fosfolípidos	-	-
Óleo cru	Até 4,0	Até 3,5
<i>Water-Degummed</i>	Até 4	Até 0,8
<i>Acid-Degummed</i>	Até 0.2	-
FFA (%)	0,3 – 1	0,5 – 1,8
Insaponificáveis (%)	0,5 – 1,6	0,5 – 1,2
Tocoferóis (ppm)	1700 – 2200	700 – 1000
Clorofilas (ppm)	Vestígios	5 – 35
Sulfato (ppm)	Vestígios	3 – 25

Dois processos têm sido desenvolvidos com vista a esse objetivo: Refinação Química e Refinação Física. A escolha do método a usar depende do tipo e da quantidade de óleo cru a processar, visto que o processo tecnológico utilizado na remoção dos FFA difere entre ambos. A refinação física faz uso do baixo ponto de ebulição dos FFA quando comparado com o ponto de fusão dos triglicéridos, enquanto que na refinação química é usada uma solução alcalina para neutralizar os FFA (Zeldenrust, 2014).

IV.2 - Refinação Química ou Física?

A Refinação Química é recomendada para óleos com baixo teor de acidez (FFA) e consiste em quatro etapas principais: Desgomagem/Neutralização, Lavagem, Branqueamento e Desodorização. Neste caso, a maioria dos FFA e outras impurezas são neutralizadas com uma solução alcalina, geralmente Soda Caustica (NaOH), formando sabões que são depois removidos por centrifugação e/ou lavagem (O'Brien, 2009).

A Refinação Física é recomendada para óleos e gorduras com alto teor de acidez (FFA) e consiste em quatro etapas principais: Desgomagem, Branqueamento, Destilação e Desodorização. (Tecnologias, 2014) Neste processo, os FFA são removidos por destilação durante a desodorização sendo que os fosfatídeos e outras impurezas devem ser previamente removidos por destilação a vapor (O'Brien, 2009).

A Refinação Física começou a ser utilizada em 1930 como um processo anterior à neutralização alcalina de produtos com elevado nível de FFA. Contudo, só em 1950 é que foi possível refinar fisicamente óleo vegetal com baixos níveis de fosfatídeos e elevados níveis de FFA, sendo que só recentemente foi possível refinar fisicamente óleos vegetais com elevados níveis de fosfatídeos, como o óleo de Soja e de Colza (O'Brien, 2009). Este bloqueio tecnológico foi uma das principais razões que levaram a Sovena Oilseeds S.A., anterior TAGOL, a optar pela Refinação Química.

Para além do diferente desenvolvimento tecnológico, cada tipo de refinação possui os seus prós e contras. As duas principais desvantagens relativamente à Refinação Química são os custos com o tratamento do *soapstock* e das correntes de resíduos, e a perda de óleo neutro, que reduz o rendimento global do processo. Para além disso, apesar de a Destilação na Refinação Física conseguir remover os FFA e carotenoides, as restantes impurezas permanecerão no óleo como os carotenos, clorofila, fosfatídeos, metais, açúcares livres e lípidos oxidantes (O'Brien, 2009).

Por fim, apesar de a Refinação Física ser altamente favorável economicamente para óleos de palma, as análises indicam que não existem vantagens/ganhos em termos de custos de operação quando se refina fisicamente óleo de soja ou colza. Um óleo refinado fisicamente é equivalente a um óleo refinado quimicamente. Para além disso, o óleo refinado fisicamente, mesmo após branqueamento, ainda pode apresentar problemas na estabilidade oxidativa e risco de cor insatisfatória pelo facto de que certas impurezas não estarem em conformidade com os padrões de qualidade exigidos (O'Brien, 2009).

IV.3 - Refinação Química

Na Sovena, a refinação do óleo alimentar é feita através da Refinação Química pelos motivos referidos na secção anterior, e apresenta as etapas referidas na figura seguinte:

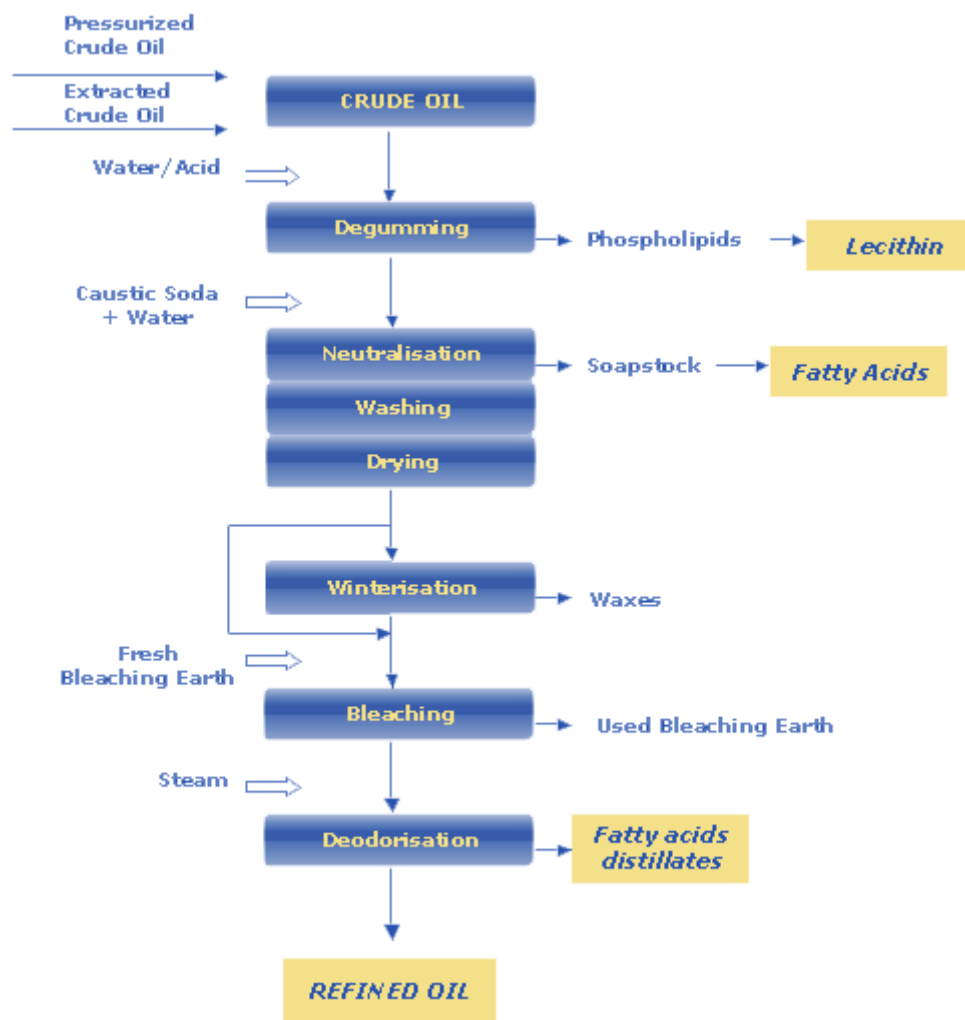


Figura 4.1 - Esquema Geral da Refinação Química (FEDIOL, 2014)

IV.3.1 - Desgomagem e Neutralização (*Degumming and Neutralisation*)IV.3.1.1 – Desgomagem (*Degumming*)

A desgomagem é frequentemente a primeira etapa do processamento de óleos crus, que contêm quantidades relativamente elevadas de fosfolípidos, sendo a desgomagem utilizada para remover esses fosfolípidos do óleo cru de forma a melhorar a sua estabilidade física e facilitar a restante refinação. FFA, pigmentos, e outras impurezas também são parcialmente removidos na

desgomagem. A quantidade total de fosfolípidos no óleo de soja cru varia entre 1,85% e 2,75% e depende da preparação da semente e do método de extração empregue. (Hammond, Johnson, Su, Wang, & White, 2005)

Fosfolípidos podem existir na sua forma hidratável, que podem ser facilmente removidos através da adição de água, ou na sua forma não-hidratável, que são mais difícil de hidratar e remover. Estes fosfolípidos não hidratáveis são sais de cálcio e magnésio de ácido fosfatídico, que são formados por hidrólise enzimática dos fosfolípidos originais. Esta degradação pode ser um resultado de dano sofrido durante o armazenamento ou mau manuseamento. (Hammond, Johnson, Su, Wang, & White, 2005)

A extração dos fosfolípidos baseia-se no princípio de que, quando tratados com substâncias hidratantes, o complexo água-fosfatídeo torna-se mais denso que o óleo e podem ser removidos por precipitação ou centrifugação. Água tem sido o agente hidratante mais comum na separação de fosfolípidos hidratáveis (cerca de 90% dos fosfolípidos presentes no óleo cru são hidratáveis) podendo-se conseguir um rendimento na extração de 95%-98%. A quantidade de água adicionada é crucial para um bom rendimento: se a água adicionada for menor que a necessária, a hidratação não irá ocorrer de forma apropriada, e se a quantidade de água foi maior que o valor ótimo haverá grandes perdas de óleo e um decréscimo da percentagem de fosfatídeos no resultado de gomas extraídas. (P. Eshratbadi, 2008)

Os fosfolípidos não-hidratáveis são mais difíceis de remover e requerem um aumento de temperatura juntamente com o uso de ácido fosfórico, ácido cítrico ou outra substância de desgomagem. O ácido fosfórico não é hidratável quando na forma de sais de cálcio e magnésio sendo necessário decompor o complexo fosfatídeo/metálico através da adição de ácido ou de um agente complexante, seguindo-se a hidratação com água. (Zufarov, Schmidt, & Sekretár, 2008)

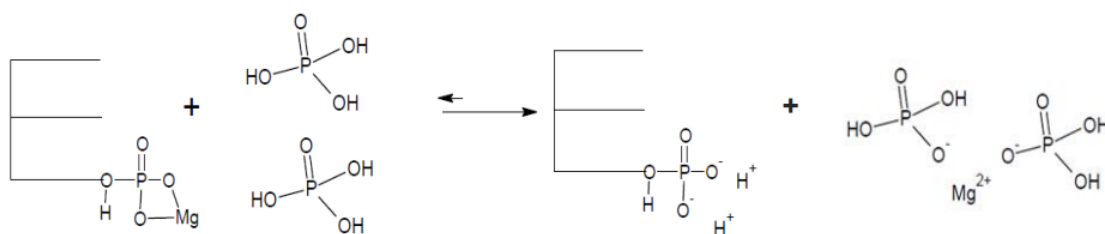


Figura 4.2 - Reacção de Desgomagem Química (Oliveira, 2012)

Vários fatores que influenciam a hidratação dos fosfolípidos têm sido documentados como a quantidade da substância hidratante, temperatura de hidratação, tempo de residência, entre outros. (P. Eshratbadi, 2008)

Para além da remoção dos fosfatídeos, a desgomagem tem como objetivo (O'Brien, 2009).:

- Precipitar o cálcio e magnésio como sais de fosfato insolúveis;
- Inativar os metais, como ferro e cobre, que poderão estar presentes no óleo;
- Reduzir as perdas de óleo neutro;
- Destabilizar e melhorar a remoção de clorofila no branqueamento;
- Melhorar a cor e a estabilidade do sabor do óleo final refinado.

IV.3.1.2 – Neutralização (Neutralisation)

A neutralização é também referida como refinação cáustica ou alcalina. A neutralização é conseguida através do tratamento do óleo com uma solução aquosa alcalina (normalmente hidróxido de sódio) para neutralizar os FFA. Os sabões formados (Fig. 4.3) na reação também absorvem pigmentos, gomas e outras substâncias não removidas na desgomagem. (Hammond, Johnson, Su, Wang, & White, 2005)

Contudo a soda caustica não é completamente seletiva na reação com os FFA e fosfatídeos; por isso, alguns triglicéridos são hidrolisados e saponificados. É então importante regular a força da soda caustica e a sua exposição com o óleo de forma a maximizar o rendimento do óleo refinado (Karasulu, et al., 2011).

A adição de excesso de soda caustica nesta fase tem de ser controlada pois, se a percentagem em excesso for inferior ao adequado, o óleo final não é neutro e existe uma maior probabilidade de formação de emulsões. Se a percentagem de excesso for demasiado elevada, poderá ocorrer a saponificação do óleo neutro e portanto a força do NaOH, o tempo de mistura, temperatura e a quantidade do excesso de soda cáustica são parâmetros importantes no processo de neutralização. (O'Brien, 2009).

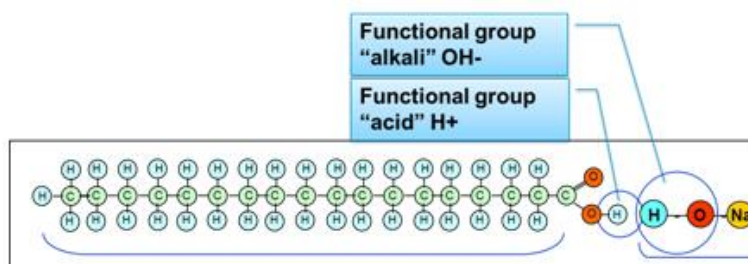


Figura 4.3 - Reação de Saponificação dos Ácidos Gordos Não-Esterificados (Zeldenrust, 2014)

De seguida, o óleo é centrifugado para remover a emulsão e o *soapstock* do óleo neutro. Nesta etapa do processo, os fatores mais importantes a considerar são: a gravidade específica de ambas as fases, quanto maior a diferença melhor; as baixas viscosidades; as elevadas

temperaturas com o cuidado de evitar a saponificação ou deterioração do óleo neutro; a força da centrifugação e o tempo de residência (O'Brien, 2009).

IV.3.2 – Lavagem (Washing)

O sabão que permanece no óleo, após a centrifugação, não é aceitável para continuar o processamento do óleo devido ao facto de colmatarem os filtros e porque o fósforo tem uma grande afinidade para os sabões. Por isso, é lavado com água, de forma a ser possível a remoção por dissolução dos sabões. (Christenson, 1983).

A temperatura da água de lavagem é importante para uma separação eficiente na centrífuga, idealmente deverá estar cerca de 10-15°C acima da temperatura do óleo a uma percentagem de 10% (Christenson, 1983).

A solução água/sabão é então separada do óleo na centrífugadora na centrífugadora de lavagem com água. É essencial manter uma temperatura constante e um fluxo estável para uma separação eficiente. (Christenson, 1983)

A água de lavagem é conduzida para um tratamento de efluentes adequado.

IV.3.3 – Branqueamento (*Bleaching*)

Esta operação tem como objetivo a remoção de pigmentos do óleo, como clorofilas, xantofilas e carotenóides, parcialmente destruídos durante a neutralização (Batinas, 2006). No entanto, estes pigmentos são só parte de uma enorme variedade de impurezas que o Branqueamento visa remover. As outras funções do branqueamento podem ser assim descritas (Alfa Laval, 2004):

- Decomposição e remoção parcial de produtos de oxidação;
- Remoção de contaminantes como resíduos de sabões ou metais;
- Remoção dos fosfatídeos restantes;
- Remoção de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's).

Para tal, o branqueamento recorre a diversos agentes sendo que os mais utilizados são as terras de branqueamento naturais ou ativadas, o carvão ativado e compostos sintéticos de sílica amorfa. (Alfa Laval, 2004) Estes agentes são misturados com o óleo.

Podem-se discriminar dois tipos de branqueamento: *dry bleaching* e *wet bleaching*.

No *dry bleaching*, o óleo é aquecido (+/-100°C), misturado com uma solução de ácido cítrico (que se irá ligar aos restantes metais e decompor sabões residuais) e depois será adicionado com terras de branqueamento, carvão ativado ou uma mistura de ambos. Tal processo é feito em

vácuo (max. 70 torr) para prevenir oxidação e reduzir a humidade no óleo. De seguida, os agentes de branqueamento são removidos através do uso de filtros (Alfa Laval, 2004).

As principais vantagens do *Dry Bleaching* são (Alfa Laval, 2004):

- Reduzido investimento inicial comparando com os restantes tipos de branqueamento;
- Fácil operação e controlo;
- Instalação requer espaço mínimo;
- Consumo de energia mínimo.

No *Wet Bleaching* adiciona-se uma pequena quantidade de água ao óleo enquanto este está em contacto com as terras de branqueamento. A presença de pequenas quantidades de água aumenta a eficiência global pois, para além de reduzir a quantidade de terras de branqueamento (reduzindo os custos), também reduz as perdas de óleo derivadas da adição das terras de branqueamento. Contudo, a água introduzida no óleo terá de ser removida, através do vácuo, pois até mesmo a mais pequena quantidade irá afetar a filtração (Alfa Laval, 2004).

As principais vantagens do *Wet Bleaching* são (Alfa Laval, 2004):

- Uso mais eficiente das terras de branqueamento;
- Fácil de combinar com o tratamento de sílica;
- Muito flexível;
- Baixo consumo de terras de branqueamento;
- Redução de perdas de óleo na filtração.

Contudo, independentemente do tipo de processo usado, existem parâmetros inerentes ao processo geral que necessitam de atenção de entre os quais se devem destacar: procedimento, tipo de adsorvente e dosagem usada, temperatura, tempo de residência e humidade (O'Brien, 2009).

IV.3.4 – Desodorização (*Desodorization*)

A desodorização é a última etapa da refinação que envolve elevadas temperaturas e vácuo, durante a qual os FFA residuais e outras substâncias odoríferas, como aldeídos, cetonas, peróxidos, álcoois, vestígios de pesticidas e outros compostos residuais (esteróis e tocoferóis) são removidos para obter um óleo sem cheiro nem sabor (Batinas, 2006). Para além disso, as suas características físicas e químicas devem ser garantidas para uma estabilidade a longo prazo.

Nesta fase, o óleo começa por ser aquecido progressivamente, através de permutadores de calor e um aquecedor no final, até aos 230-245°C, de forma a intensificar o processo. O óleo é então introduzido num desodorizador, onde é também injetado vapor de arraste, entre os 230-340°C,

que irá gerar turbulência no óleo, facilitando a destilação dos compostos voláteis e outros componentes odoríferos. Depois será arrefecido, através de permutadores de forma a melhorar a eficiência energética de todo o processo, para posterior armazenagem (Batinas, 2006).

Ao óleo desodorizado é adicionada uma solução de ácido cítrico a 20%, sendo usado para evitar formação de peróxidos e aumento da taxa de oxidação. Por fim, o óleo passa por filtros de segurança e recebe uma saturação de azoto para evitar oxidação nos tanques de armazenamento (Batinas, 2006).

Relativamente aos resíduos da desodorização, são produzidos em média 1-1,5kg de destilados por tonelada de óleo, sendo que 50% são ácidos gordos e contém uma percentagem elevada de tocofecóis (Batinas, 2006).

A temperatura e o vácuo são dois parâmetros interrelacionados e dos mais importantes pois o ponto de ebulição dos ácidos gordos e a pressão de vapor dos materiais odoríferos decresce com a diminuição da pressão absoluta, sendo que esta geralmente encontra-se entre os 2-4 mbar. Para além disso, é necessário ter cuidado pois uma temperatura excessiva resulta no desenvolvimento de reações de polimerização, isomerização, *cracking* térmico, alteração da cor e destilação de tocofecóis (O'Brien, 2009).

O tempo de retenção é definido como o período de tempo em que o óleo está a temperatura de desodorização e sujeito à ação do vapor. Este tempo de retenção tem de ser suficiente para reduzir os componentes odoríferos até ao nível pré-definido. Esta variável de processo só depende do tipo de equipamento usado; em geral, para sistemas de desodorização *batch* são 3 a 8 horas enquanto que para sistemas semi-contínuos ou contínuos varia entre 15 a 120 minutos (O'Brien, 2009).

V – Etapa de Branqueamento

No processo de refinação em óleos vegetais mais propriamente na etapa de branqueamento, recorre-se ao fenómeno de adsorção para a remoção de diversos pigmentos. A adsorção consiste na retenção de uma espécie química na superfície de um sólido. A substância sobre cuja superfície tem lugar a adsorção designa-se por adsorvente. A substância adsorvida é designada por adsorvato (Batinas, 2006).

O processo de adsorção depende de vários fatores (Batinas, 2006):

- Superfície do adsorvente;
- Natureza do adsorvato e sua interação com o solvente;
- Influência do solvente;
- Natureza das interações entre a superfície do adsorvato e o soluto adsorvido;
- Estrutura da camada adsorvida;
- Efeito da temperatura.

Têm sido propostos diversos agentes químicos mas os mais usados para a descoloração e purificação de óleo alimentar são: terras de adsorção, sílica sintética e carvão ativado (O'Brien, 2009).

V.1 – Adsorventes

A utilização de terras para a remoção de pigmentos em óleos vegetais não é um procedimento novo. As terras de Fuller são utilizadas há muito tempo na descoloração de óleos vegetais sendo materiais que não necessitam de nenhum tratamento físico ou químico, pois possuem uma capacidade descolorante natural. Contudo o tratamento (físico e/ou químico) em alguns tipos de terras incrementou as propriedades de adsorção dos pigmentos presentes em óleos vegetais. Estas terras de branqueamento são então necessárias pois, se a clorofila não for removida, a degradação do óleo ocorrerá num curto período de tempo (Patricio, Hotza, & De Noni Júnio, 2014).

Os adsorventes encontram-se geralmente na forma de pó ou pequenos grânulos tendo na sua generalidade uma estrutura muito porosa, podendo estes poros representar até 50% do volume total da partícula. O fenómeno de adsorção ocorre na superfície dos pequenos poros (Batinas, 2006).

O adsorvente ideal deve ter como características (Batinas, 2006):

- Alto poder descolorante;
- Não provocar a degradação de pigmentos;
- Boa filtração;
- Permitir incrementar a temperatura de branqueamento sem alteração do óleo;
- Baixa retenção de óleo nas terras;
- Produto final de qualidade;
- O adsorvente ideal deve ainda possuir uma afinidade elevada para os compostos a remover e baixa afinidade para os outros compostos.

V.1.1.1 - Terras de Branqueamento Naturais

Terras de bentonite exibem propriedades de adsorção no seu estado natural, sendo classificadas como terras de branqueamento naturais. A estrutura da rede molecular, tamanho da partícula e estrutura macroporosa são características que afetam a capacidade das terras absorverem água, óleo, fosfatídeos, sabões, pigmentos e metais. As melhores terras conseguem absorver 15% do seu peso em pigmentos e outras impurezas, mas retêm 30% de óleo neutro. Este tipo de terras tem performances melhores no Branqueamento Atmosférico (sem adição de vácuo) e são aplicadas em óleos de fácil branqueamento, como o de coco ou gordura animal. As terras de branqueamento naturais não elevam o teor de FFA nem isomerizam grupos de ácidos gordos insaturados (O'Brien, 2009).

V.1.1.2 - Terras de Branqueamento Ativadas

Terras de bentonite são também usadas para produzir terras de branqueamento ativadas, mas têm uma elevada proporção de montmorillonite. Este silicato de alumínio hidratado tem uma capacidade considerável para trocar parte do seu alumínio por magnésio, metais alcalinos e outras bases. Um facto interessante é que a maioria das bentonites que exibem alto poder de branqueamento natural não podem ser usadas para 'ativação', e a maioria das terras para produto de ativação têm uma baixa atividade para branqueamento natural (O'Brien, 2009).

O tratamento químico das terras, de nível variável, com ácido hidrocloreto ou sulfúrico, lavagem, secagem e moagem alteram os níveis de acidez, adsorção e distribuição do tamanho de partícula. Durante estes processos, a estrutura física e a composição química das terras de branqueamento são modificadas de forma a adquirirem características específicas para o processo onde irão ser utilizadas. Uma terra de branqueamento eficiente é produzida com uma superfície com a composição química correta e distribuição de poros seletiva, em detrimento de

outras características. Em geral, as melhores partículas são aquelas com tamanho mais fino, mas partículas demasiado pequenas criam graves problemas durante a filtração e a retenção é aumentada. Portanto, o adsorvente usado deverá ter o tamanho mínimo possível de forma a possibilitar uma filtração sem problemas (O'Brien, 2009).

Um outro pormenor importante é o de que as terras de branqueamento ativadas normalmente contêm 10 a 18% de humidade para suporte das camadas de montmorillonite nas terras. Se as terras forem completamente secas antes do branqueamento, as camadas colapsam e decresce a superfície disponível para absorver os pigmentos e outras impurezas (O'Brien, 2009).

Estas terras de branqueamento ativadas estão mais predispostas a separar os resíduos de sabões, a destruir peróxidos e produtos secundários de oxidações e a promover isomerizações. O último efeito é mais pronunciado acima dos 150°C, o que é bem acima das condições de operação ótimas. As terras de branqueamento modificadas são especialmente uteis no branqueamento dos óleos mais difíceis como o de soja. (O'Brien, 2009)

A acidez induzida numa terra de branqueamento tem uma grande ligação com o seu objetivo final como pode ser visto na figura 5.1.

Need	Natural	Moderate	High
Chlorophyll		←→	←→
Finished Oil Color	←→	←→	
Low FFA Rise	←→	←→	
Phosphorus	←→	←→	←→
"Organic"	←→		

Figura 5.1- Nível de ativação necessário dependendo do composto a remover (Zeldenrust, 2014)

V.1.1.3 - Ativação ácida e adsorção do Pigmento

A ativação começa com a separação da bentonite do restante material como o calcário na própria mina e segue depois para a unidade de ativação, onde é esmagada até um tamanho conveniente, e se necessário, o excesso de humidade é removido. A rocha granulada é então misturada com uma porção de água e ácido, geralmente HCl ou H₂SO₄. A mistura é então aquecida até perto do seu ponto de ebulição por algumas horas até se atingir a qualidade do produto necessário. Segue-se a lavagem até se obter o ácido residual pretendido, e depois secagem, moagem e empacotamento. A proporção do ácido usado e a duração da extração são fatores importantes para o sucesso desta operação (List, 2009).

As alterações físicas e químicas trazidas pela ativação podem ser observadas pela seguinte sequência:

1. Cátions de alumínio, magnésio e ferro são 'lixiviados' pelo ácido do centro das três camadas da estrutura octaédrica. São criadas lacunas na estrutura cristalina e é aumentada a superfície interna.
2. Agora cátions mais ácidos (Al^{3+} , Mg^{2+} e Fe^{2+}) substituem os anteriores cátions (Ca^{2+} , Na^+ e K^+). Assim ocorre um aumento na concentração de centros activos com maior acidez – não apenas acidez total superficial (List, 2009).

Quando o óleo com pigmentos entra em contacto com as terras ativadas, os cátions dos centros altamente acidificados estão prontos para doar um protão ao pigmento, que geralmente contém ligações electrofílicas preparadas para o receber, e assim se forma um ião carbónico positivamente carregado. A molécula do pigmento é então agarrada pela superfície através de atracção electrostática (List, 2009).

V.1.1.4 - Carvão Ativado

O carvão é um material microcristalino obtido por decomposição térmica da madeira, de cascas vegetais, entre outros produtos. O carvão ativado contém cerca de 95% a 98% de carbono, sendo caracterizado pela sua porosidade e consequente elevada capacidade de adsorção. Assim, a superfície específica de 1g de carvão ativado, pode alcançar 600-1000m² e não possuir qualquer atividade biológica. Os carvões podem ser produzidos sob a forma de pó ou na forma granular, sendo o carvão em pó utilizado principalmente na adsorção em fase líquida (Batinas, 2006).

A atividade do carvão ativado é determinada pelo estado químico e elevada área química específica. Muitas empresas usam o carvão ativado com moderação devido a problemas de filtração, custo relativamente alto, e elevada retenção de óleo (150% do seu peso em óleo). Quando utilizado, é normalmente adicionado em conjunto com terras de branqueamento, geralmente 5 a 10% do volume das terras. O carvão ativado é eficaz a remover certas impurezas que não interagem com as terras como por exemplo alguns compostos aromáticos que não são volatilizados pela desodorização podendo ser satisfatoriamente removidos com carvão ativado tais como PAH's (O'Brien, 2009).

V.1.1.5 - Adsorvente de Sílica

A sílica é um composto adsorvente amorfo sintético e quimicamente inerte com afinidade para contaminantes polares. A área superficial, porosidade e humidade dos adsorventes de sílica dão-lhe a capacidade de adsorver produtos secundários da oxidação como aldeídos e cetonas,

compostos fosfatídico, compostos sulfurosos, metais e sabões. Geralmente a sílica necessita de um pouco de humidade pois esta mantém os poros abertos e ajuda a atrair impurezas polares. Muitas das sílicas sintéticas não têm capacidade de adsorção significativa para carotenóides e clorofilas, mas a remoção das outras impurezas aumentam a eficácia das terras de branqueamento. Geralmente a sílica é introduzida antes das terras de branqueamento. Este procedimento reduz a quantidade de terras de adsorção gastas necessárias para remover os pigmentos (O'Brien, 2009).

V.2 - Adsorção e Isotérmicas de adsorção

A adsorção (física) é um fenómeno superficial, em que as moléculas da fase fluida são reversivelmente retidas na superfície de um sólido (adsorvente) por forças Van der Waals, formando uma camada (monocamada) ou multicamadas de moléculas. Uma vez que a adsorção é um fenómeno de superfície, é importante que os adsorventes proporcionem uma grande área superficial externa e interna associada à estrutura porosa. A capacidade de adsorção depende, portanto, do tipo e tamanho dos poros, bem como a sua distribuição, e da natureza da superfície do adsorvente (Separações e Operações Unitárias, 2014).

Durante o processo de adsorção, estabelece-se um equilíbrio de concentração para o adsorvato. Quando o equilíbrio termodinâmico da concentração de adsorvato estiver estabelecido entre a solução e o adsorvente, não ocorre qualquer adsorção adicional (Doran, 1996).

A partição entre a fase fluida e a fase adsorvida envolve um equilíbrio de fases baseado em princípios termodinâmicos. A forma mais comum de descrever este equilíbrio é expressar a quantidade de soluto adsorvido por quantidade de adsorvente (q) em função da concentração do soluto em solução (C) a temperatura constante. Uma expressão deste tipo designa-se por isotérmica de adsorção (Separações e Operações Unitárias, 2014).

As isotérmicas de adsorção, vulgarmente utilizadas em sistemas biológicos de separação são fundamentalmente de quatro tipos, conforme Fig. 5.2:

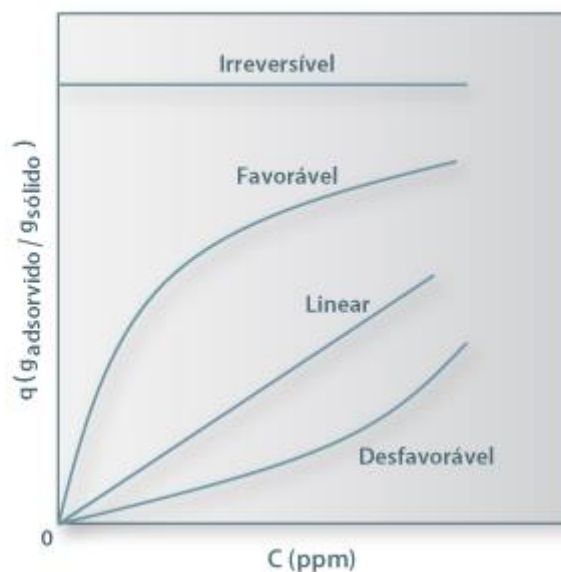


Figura 5.2 - Isotérmicas de adsorção mais comuns (Anónimo, 2014)

As isotérmicas do tipo Linear não são muito frequentes, embora sejam uma boa aproximação para sistemas de diluição elevadas. As isotérmicas do tipo Favorável, resultam do facto de os centros ativos com maior afinidade tenderem a ser preenchidos em primeiro lugar. As isotérmicas de tipo desfavorável, com forma côncava, são indicativas de adsorção em várias camadas, significando que a adsorção é do tipo não é favorecida (Belter, Cussler, & Hu, 1988).

A isotérmica de Freundlich tem sido usada para descrever a adsorção de pigmentos durante o processo de branqueamento dos óleos vegetais. No entanto ainda permanecem por explicar alguns aspetos relacionados com a adsorção de outros componentes, como os FFA's e fosfolípidos, a partir de sistemas de multicomponentes reactivamente complexos, como é o caso dos óleos vegetais (Batinas, 2006).

V.3 - Parâmetros do Branqueamento

V.3.1 - Dosagem das Terras de Branqueamento

A quantidade de terras de branqueamento usadas depende do tipo de adsorvente e do tipo de óleo a refinar, bem como a quantidade a adsorver de pigmentos e outras impurezas. No entanto, a percentagem de terras usadas variam entre os 0,15% e os 4% e só em casos extremos é que são usadas quantidades mais elevadas. Como dito anteriormente, as terras ativadas são muito mais eficientes do que as terras naturais em termos da eficiência no branqueamento, em

particular em óleo escuros ou com elevados teores em clorofila. Em termos de atividade de adsorção, as terras ativadas são cerca de 1,2 a 2 vezes superiores como agentes de branqueamento do que as terras naturais. Assim, é necessário o uso cuidadoso relativamente à quantidade de terras ativadas pois, para além de uma dosagem correta ser mais rentável, o uso de terras em excesso pode conduzir à instabilidade oxidativa, do sabor e até da cor. A escolha da quantidade correta de terras deve levar em consideração a remoção de todas as impurezas sendo que os peróxidos devem ser reduzidos até 0ppb, a clorofila até 0,5 ppb, para óleos de soja, e o fósforo reduzido para menos de 1ppm (O'Brien, 2009).

V.3.2 – Temperatura

As terras de branqueamento bem como o carvão ativado devem ser misturadas no óleo a temperaturas relativamente baixas (70°C), sendo posteriormente a temperatura da mistura aumentada para 90-100°C. Testes mostram que o óleo escurece quando os adsorventes são adicionados quentes ao óleo, sendo este efeito causado por:

- Adição do adsorvente ao óleo quente reduz a capacidade de adsorção porque a humidade é expulsa demasiadamente rápida causando o colapso da estrutura cristalina, o que reduz a área de superfície efetiva para a adsorção de impurezas e pigmentos;
- O óleo fica desprotegido com a oxidação quando aquecido antes da adição do adsorvente, o que causa alguma fixação da cor. (O'Brien, 2009)

A atividade das terras de branqueamento aumenta proporcionalmente com a temperatura através da redução da viscosidade do óleo, mas a descoloração decresce após a temperatura ótima. A temperatura ótima varia de acordo com o tipo de óleo e o tipo de branqueamento usado mas para a maioria dos óleos alimentares encontra-se entre os 70 e os 110°C. Contudo, a temperatura afeta outras propriedades do óleo, por isso deve ser mantida o mais baixo possível para evitar danos no produto, mas elevada o suficiente para que haja adsorção adequada de impurezas e pigmentos. Por exemplo, baixas temperaturas favorecem a retenção dos pigmentos na superfície de adsorção, enquanto que elevadas temperaturas favorecem a circulação dentro dos poros, onde ocorre a quimisorção, que promove alterações estruturais no grupo de ácidos gordos insaturados. Temperaturas extremamente elevadas devem ser evitadas para prevenir a isomerização de ácidos gordos insaturados e excessivo desenvolvimento de FFA (O'Brien, 2009).

V.3.3 - Tempo de Residência

Em teoria, a adsorção deveria ser instantânea; contudo, na prática, o índice de cor decresce muito rapidamente durante os primeiros minutos em que o adsorvente entra em contacto com o óleo e estabiliza quando atinge o equilíbrio e a cor já não é removida. É necessário tempo para o adsorvente libertar toda a humidade ligada e ocupar com pigmentos e impurezas até à capacidade total. Geralmente, o tempo de contacto ideal é de 15 a 20 minutos, para temperaturas abaixo dos 100°C (O'Brien, 2009).

V.3.4 – Humidade

A presença de alguma humidade é essencial para uma adsorção e ação de branqueamento. Terras de branqueamento completamente secas antes de serem usadas revelaram-se inativas. Os adsorventes normalmente contêm 10% a 18% de humidade, que atua como um suporte estrutural. Durante o branqueamento, é necessário remover a humidade para se obter a capacidade de adsorção ideal; os pigmentos e as impurezas não podem ser adsorvidos até à sua máxima capacidade se a humidade não for removida. Esta é removida através do aumento da temperatura do óleo e da presença de vácuo. Contudo a humidade ligada não é removida enquanto não forem atingidas as temperaturas de branqueamento mais elevadas (O'Brien, 2009).

Óleos neutros lavados não contêm menos de 0,1% de humidade, tendo no um máximo de 1% de humidade. Testes revelam que um óleo levemente molhado pode ser benéfico para a remoção de pigmentos e precursores de sabor para se obter um óleo mais leve e estável (O'Brien, 2009).

V.4 – Filtração

Após o adsorvente ter capturado seletivamente as impurezas, deve ser removido do óleo, pois caso contrário tornar-se-á um catalisador para o desenvolvimento de cor e reações indesejáveis. Para tal pode ser usada uma etapa de filtração cujo material filtrante mais comum são os filtros de papel ou pano, malhas e membranas (O'Brien, 2009).

Os três passos da filtração são: *precoating*, filtração e limpeza. O *precoating* serve para proteger o filtro, providenciar claridade imediata, melhorar o fluxo, e ajudar na remoção do bolo durante a limpeza do filtro (O'Brien, 2009).

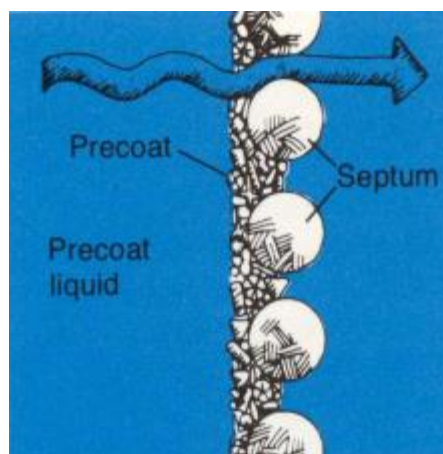


Figura 5.3 - Representação do Princípio base do *Precoating* (Amfilter Group, 2008)

Diversos indicadores são utilizados para determinar o ponto em que os poros do filtro ficam preenchidos com sólidos do óleo branqueado: quando a queda de pressão baixa demasiado, quando um valor predeterminado de caudal decresce, ou quando é alcançado o nível de carga. A paragem prematura é geralmente derivada de (O'Brien, 2009):

- Caudal de entrada inadequado;
- Caudal demasiado elevado, o que pode causar empacotamento dos sólidos;
- Caudal demasiado baixo, o que pode fazer com que os sólidos precipitem e bloqueiam a passagem da corrente;
- *Blinded screens*, que irá reduzir a superfície do filtro;
- Se a carga de sólidos exceder a capacidade do filtro.

V.5 – Pigmentos

A cor de um óleo alimentar pode derivar de diversos pigmentos presentes em diferentes concentrações no óleo, sendo que se considera que só quando as impurezas do óleo são removidas é que a verdadeira cor do óleo se torna visível.

Neste contexto, a cor do produto final é condicionada por dois fatores (Patterson, 2009):

- Como a natureza química de cada pigmento difere, a cor irá depender do processo de remoção utilizado;
- Pode ocorrer decomposição dos principais pigmentos ou reações com compostos 'non fatty' presentes no óleo.

A coloração dos óleos vegetais é devida em grande parte à presença de clorofilas *a* e *b*, feofitinas, carotenos, xantofilas e outras substâncias, sendo que a quantidade de cada pigmento depende

das características da semente e condições de armazenamento e processamento. (Batinas, 2006) A quantificação destes compostos numa fase inicial do processo é importante pois grande parte destes compostos são de origem natural, como a clorofila e os carotenoides, sendo que os restantes de origem oxidativa, como as feofitinas. Estes últimos são responsáveis por colorações acastanhadas e podem tornar-se um problema pois não são facilmente adsorvidos pelos adsorventes utilizados no branqueamento de óleos.

V.5.1 – Clorofila

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas. As diferenças na cor de uma planta são devidas à presença e distribuição variável de outros pigmentos, como os carotenoides, os quais acompanham sempre as clorofilas. Atualmente estes pigmentos são de grande importância comercial, podendo ser utilizados como pigmentos ou antioxidantes (Batinas, 2006).

As clorofilas são pigmentos fotosensibilizadores encontrados em quantidades significativas nos óleos de soja e colza (2-4 ppm) que para além de intensificarem o fenómeno de fotooxidação e tornarem o óleo instável para desodorização, são quimicamente instáveis podendo ser facilmente alterados ou destruídos sob fatores como luz, calor, ácidos, oxigénio e degradação química (Streit N. M., Canterle, Canto, & Hecktheuer, 2005).

As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central magnésio (figura 5.4) e uma estrutura macrocíclica assimétrica insaturada. A diferença entre a clorofila *a* e *b*, que se encontram nas proporções 3:1, é o substituinte no carbono C3. Enquanto a clorofila *a* contém um grupo metil, a clorofila *b* contém um grupo aldeído (Batinas, 2006).

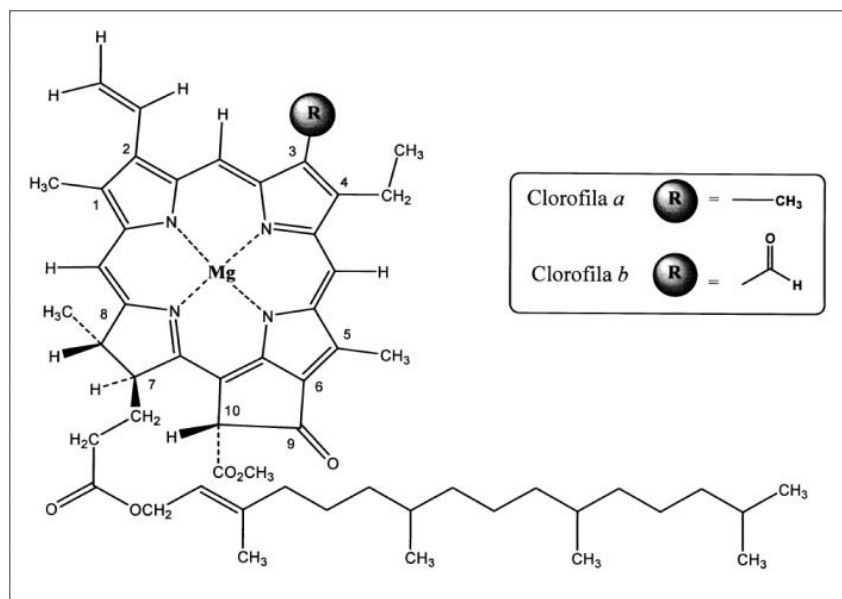


Figura 5.4 - Clorofila a e b (Streit N. M., Canterle, Canto, & Hecktheuer, 2005)

A clorofila, na refinação de óleos, funciona como um indicador de sucesso do processo de branqueamento, tendo portanto de se realizar um controlo para garantir a qualidade final do óleo. Estes pigmentos têm um espectro de absorção característica que permite uma fácil identificação. A cor verde deve-se a fortes absorções nas regiões do azul e vermelho do espectro eletromagnético na zona do visível, tendo absorção máxima nos comprimentos de onda: 630, 662, 668, 670, 672 e 710nm (Batinas, 2006).

Os dois produtos da degradação da clorofila são o feoforbídeo e a feofitina (feopigmentos) (Fig.7). Estes compostos interferem na determinação da clorofila pois adsorvem luz na mesma região do espectro podendo causar erros significativos na determinação de concentração da clorofila. Esta degradação da clorofila (feofitização) ocorre porque o átomo de magnésio é substituído por um átomo de hidrogénio. Esta perda do átomo de magnésio é extremamente rápida em meios ácidos, contudo a clorofila é relativamente estável em meios alcalinos (Batinas, 2006).

Para além da sua degradação (Fig. 5.5) é necessário ter outros cuidados pois a clorofila é capaz de induzir e/ou participar em reações fotoquímicas, das quais se devem salientar duas delas. A primeira baseia-se na promoção do fotosensibilizador ao estado excitado por absorção de luz, ocorrendo a transferência do eletrão entre a clorofila e componentes do sistema, gerando iões-radicaís. Estas espécies muito instáveis tendem a reagir com o oxigénio no estado fundamental, resultando em produtos de oxidação. A segunda baseia-se na transferência de energia do sensibilizador em estado excitado para o oxigénio, levando à formação de uma espécie reativa de oxigénio. Esta tende a interferir nas ligações duplas e a promover reações de oxidação (Batinas, 2006).

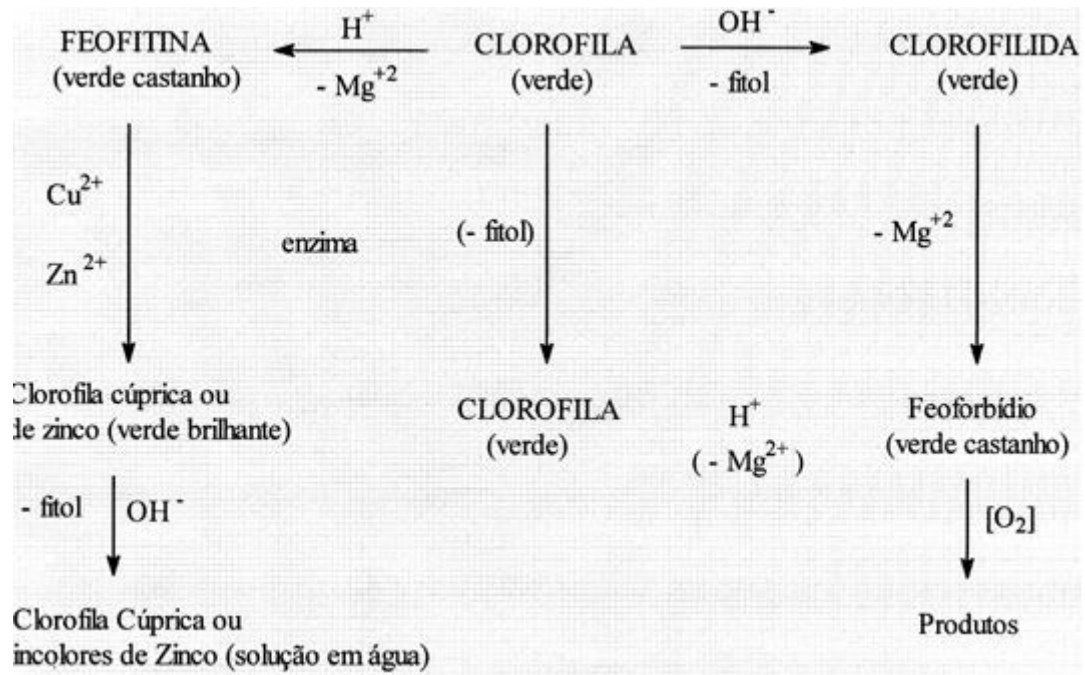


Figura 5.5 - Esquema de Degradação da Clorofila (Streit N. M., Canterle, Canto, & Hecktheuer, 2005)

VI – Espectroscopia

A espectroscopia molecular é o estudo da interação entre ondas eletromagnéticas com a matéria. Existem diversas formas de radiação eletromagnética que apesar de viajarem à mesma velocidade diferem, entre elas, em termos de frequência e comprimento de onda (Kumar, 2006). Na Figura 6.1 apresenta-se o espectro eletromagnético:

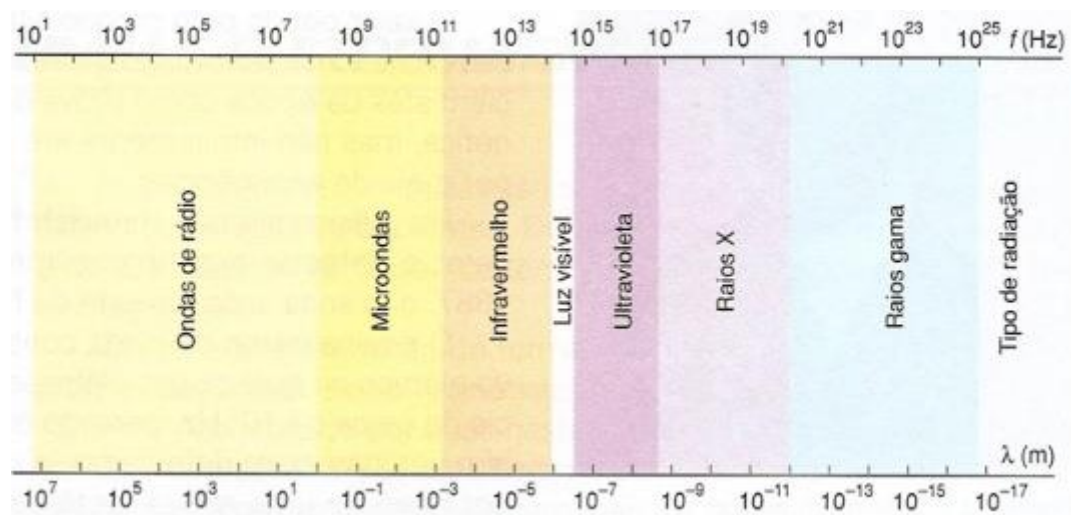


Figura 6.1 - Representação Esquemática do Espectro Eletromagnético

O termo “espectroscopia” designa toda a técnica de levantamento de dados físico-químicos através de transmissão, absorção ou reflexão de energia radiante incidente numa amostra. Existem diversos ramos na espectroscopia dependendo da grandeza física a medir, de entre os quais iremos destacar a espectroscopia eletromagnética, usada no nosso estudo. Esta envolve espectroscopia de fótons, na região do ultravioleta/visível (espectrofotometria). A análise por espectroscopia tem sido amplamente utilizada por ser um método simples, de baixo custo e fiável (Reis, 2006).

VI.1 – Espectrofotometria

A espectroscopia de absorção UV-VIS utiliza radiação eletromagnética entre os 190 nm e os 800 nm, sendo dividida em duas regiões: ultravioleta (UV, 190 – 400nm) e visível (VIS, 400 – 800nm). Por vezes, a absorção de radiação ultravioleta e visível é chamada de espectroscopia electrónica pois leva à transição entre níveis de energia eletrónicos de uma molécula (Kumar, 2006).

Em termos analíticos, são dois os princípios que regem a espectroscopia de absorção de luz:

1. Lei de Lambert: A proporção de luz incidente absorvida por um meio transparente é independente da intensidade da luz. Assim sucessivas camadas de igual espessura irão transmitir uma proporção igual de energia incidente;

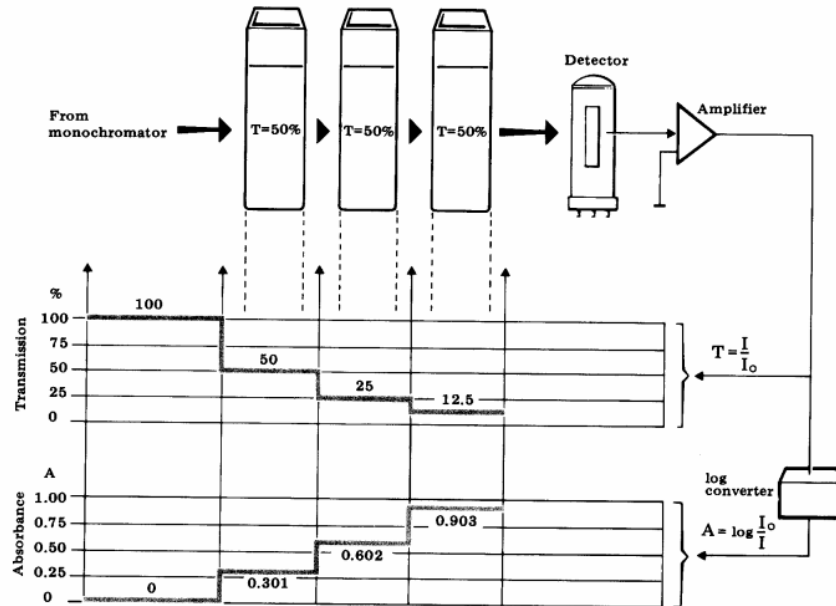


Figura 6.2 - Representação da Relação entre Transmissão e Absorção (Biochrom, 2014)

2. Lei de Beer: A absorção da luz é diretamente proporcional à concentração do meio absorvente e à espessura do meio absorvente (Biochrom, 2014)

Uma combinação das duas leis, conhecida como Lei de Lambert-Beer, define a relação:

$$A = -\log_{10}(I/I_0) = \varepsilon \times [C] \times l$$

Onde A é a absorvância medida, I_0 é a intensidade da luz incidente a um dado comprimento de onda, I é a intensidade transmitida pela amostra, l é o caminho percorrido pela luz, e ε é uma constante conhecida com absorvidade molar e [C] é a concentração da substância em mol/L. (Reis, 2006) É importante referir que o ε , coeficiente de extinção molar, é em função do comprimento de onda e a Lei de Lambert-Beer só é verdadeira para a radiação de um único comprimento de onda, ou luz monocromática (Biochrom, 2014).

Assim, é vantajoso que as soluções obedeçam à Lei de *Lambert-Beer* pois a absorvância é diretamente proporcional à concentração, bastando determinar um número reduzido de pontos para estabelecer a curva de calibração (Reis, 2006).

Este coeficiente de extinção molar de uma substância, a clorofila, será posteriormente investigado neste projeto. É uma constante e uma característica de uma espécie absorvente (molécula ou ião) num particular solvente num comprimento de onda específico (Kumar, 2006).

A espectroscopia UV-VIS é feita com recurso a soluções muito diluídas (como no caso de algumas soluções-padrão feitas neste projeto) e um dos critérios mais importantes é a escolha do solvente, devendo o solvente deve ser transparente no comprimento de onda a ser examinado. O diclorometano, usado na Sovena, não pode ser usado em comprimentos de onda abaixo dos 220 nm pois abaixo desse limite irá apresentar excessiva absorvância e portanto não poderá se usado. Para além disso, o solvente deve ser de elevada pureza e não polar para não interagir com as moléculas de soluto. Contudo, solventes polares como álcoois ou água podem estabilizar ou destabilizar as orbitais moleculares da molécula interferindo com a leitura de absorvâncias (Kumar, 2006).

A clorofila possui um espectro de absorção característico que permite uma fácil identificação. A cor verde deve-se a fortes absorções nas regiões do azul e vermelho do espectro eletromagnético na zona do visível, tendo a absorção máxima nos comprimentos de onda de 630, 662, 668, 670, 672 e 710 nm (Batinas, 2006).

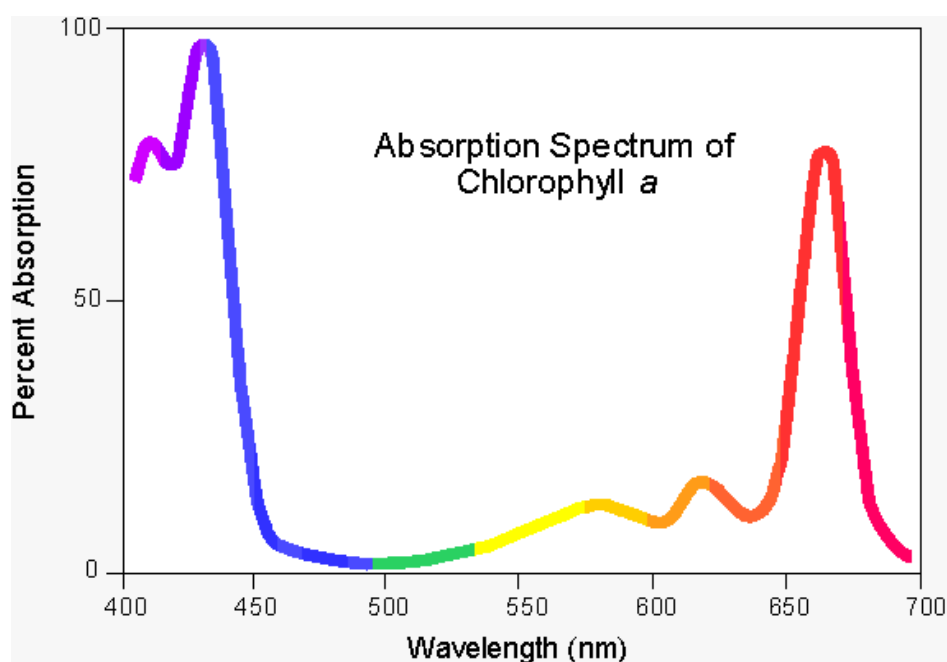


Figura 6.3 - Espectro de Absorção da clorofila (Steer, 2014)

VI.1.1 – Instrumentação

Os espectrofotômetros, como dito anteriormente, permitem obter informação sobre a absorção de uma amostra inserida no caminho ótico do equipamento e possuem as seguintes características:

- Permite selecionar o comprimento de onda da radiação adequado à análise de um determinado componente;
- Permite medir a distância do feixe emergente que corresponde a um determinado feixe incidente, convertendo o sinal recebido no detetor em medida de absorvância para o comprimento de onda em análise. Noutras palavras, permite comparar a nossa análise com um branco pré-estabelecido;
- Permite determinar a concentração para uma espécie em solução a partir do gráfico de variação de absorvância em função da concentração de várias soluções-padrão.

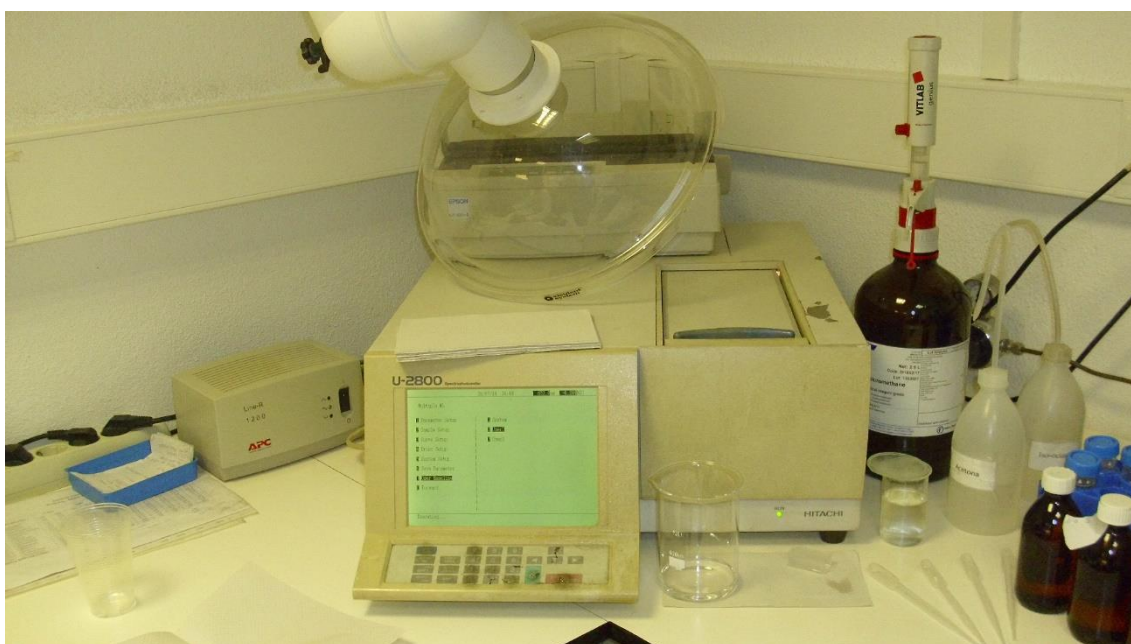


Figura 6.4 - Espectrofotómetro usado no laboratório

Os componentes principais (figura 6.5) de um espectrofotómetro e as respetivas funções são as seguintes:

- Fonte de Luz: composta por uma lâmpada de deutério (UV) e uma lâmpada de tungsténio (luz visível);
- Monocromador: separam a luz incidida em vários comprimentos de onda;
- Cuvete: recipiente utilizado para conter a amostra. Podem ser de quartzo, vidro ou acrílico, porém recomenda-se que seja usada uma cuvete de quartzo pois o vidro e o plástico absorvem UV e causam a reflexão da luz visível. Normalmente têm 1 cm para facilitar os cálculos referente à Lei de *Lambert-Beer* ;
- Detetor: dispositivo que deteta a fração de luz que passou pela amostra e transfere para o visor ou computador acoplado ao aparelho.

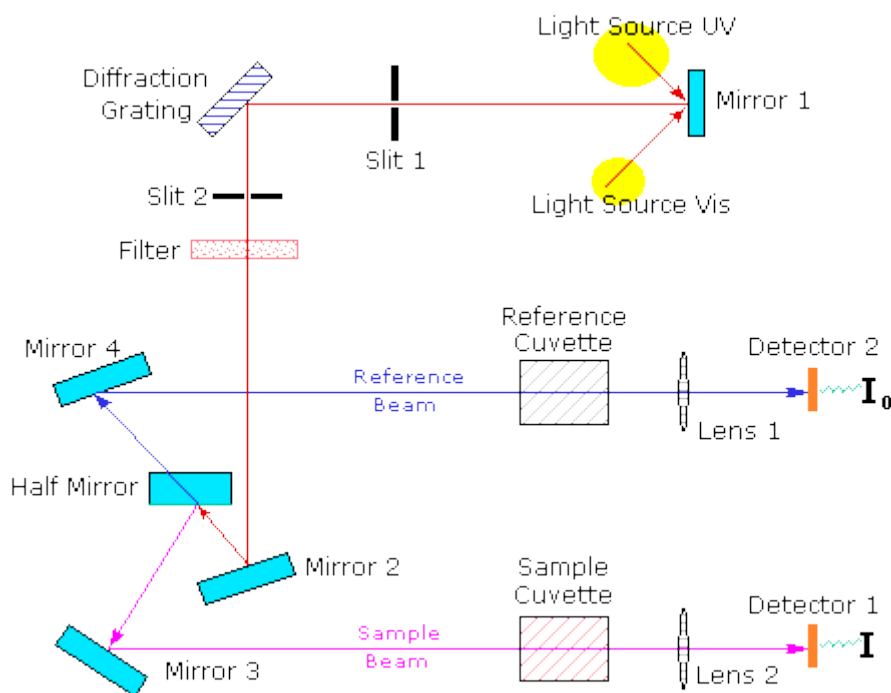


Figura 6.5 - Esquema da Instrumentação necessária a um espectrofotômetro

VI.2 – Métodos para Determinação da Concentração de Clorofila

A determinação da concentração de clorofila em óleos vegetais pode ser determinada através dos seguintes métodos de referência: Método Oficial AOCS Cc 13d-55, Método AOCS Cc13i-96, o Método BFM 0a-8, descritos de seguida. Estes têm como objetivo a determinação do conteúdo em clorofila presente num óleo, expresso em mg/kg, pela medição da absorção espectrofotométrica a 630, 662, 668, 670, 672 e 710nm.

Os três métodos anteriormente referidos serão comparados entre si e posteriormente comparados com o método já implementado na Sovena, de forma a verificar se o método implementado para a quantificação de clorofila é o mais adequado.

VI.2.1 – Método AOCS Cc 13d-55

Este método, descrito no Anexo 1, é usado para determinar a quantidade de clorofila *a* (ppm) em óleos através de medições da absorção espectrofotométrica a 630, 670 e 710nm. Aplicável a óleos refinados e branqueados. Este método não pode ser aplicado a óleos hidrogenados, desodorizados ou produtos acabados, visto que nesses óleos processados, a absorção máxima não ocorre a 670nm.

Os cálculos utilizados por este método são os seguintes:

$$\text{Clorofila (ppm)} = \frac{A_{670} - \frac{(A_{630} + A_{710})}{2}}{F \times l}$$

Eq.1

Onde: A – Absorvância no comprimento de onda respetivo (nm);

L – comprimento da cuvette (cm);

F é o fator específico de cada espectrofotómetro.

VI.2.2 – Método AOCS Cc 13i-96

Este método, descrito no Anexo 2, determina o total de pigmentos de clorofila, expresso em feofetinas a, em óleos vegetais crus. Este método é apropriado para a determinação de clorofila com quantidades superiores a 1 ppm. Os pigmentos são determinados através da medição de absorvâncias a 670nm e calculando a teor através da absortividade de feofetinas a (pigmento de clorofila mais abundante em óleos vegetais crus).

Os cálculos utilizados neste método são:

$$\text{Clorofila (ppm)} = 345.3 \times \frac{(A_{670} - 0.5 \times A_{630} - 0.5 \times A_{710})}{L}$$

Eq. 2

Onde: A – absorvância no comprimento de onda respetivo (nm);

L – comprimento da cuvette (mm)

VI.2.3 – Método BFM 0a-8

Este método, descrito no Anexo 3, é usado para determinar a concentração de clorofila a em óleos vegetais através da medição de absorvância espectrofotométricas.

Este método é aplicável a óleos crus, refinados e branqueados.

$$\text{Absorvância Corrigida} = \max\{A_{662,668,670,672}\} - \frac{A_{630} + A_{710}}{2}$$

Eq.3

Onde: A – absorvância no comprimento de onda respetivo (nm);

$$Factor\ de\ Diluição = \frac{g_{clorofila}}{g_{clorofila} + g_{solvente}}$$

Eq.4

$$Clorofila\ (ppm) = \frac{Absorvância\ Corrigida \times 1000}{L \times Factor\ de\ Diluição \times 0.04074\ (absortividade)}$$

Eq.5

Onde: L – comprimento da cuvette (mm). No caso de não haver diluição considera-se que o factor de diluição é igual a 1

VI.2.4 – Método usado atualmente na Sovena

Este método é baseado no método apresentado anteriormente da BFM 0a-8. Contudo o coeficiente de extinção molar ou absortividade, foi ajustado pela empresa ao adquirir o equipamento. Esta constante foi ajustada para o valor de 0.05452, continuando a apresentar o resultado em ppm.

$$Absorvância\ Corrigida = \max\{A_{662,668,670,672}\} - \frac{A_{630} + A_{710}}{2}$$

Eq.6

Onde: A – absorvância no comprimento de onda respetivo (nm);

$$Clorofila\ (ppm) = \frac{Absorvância\ Corrigida \times 1000}{L \times Factor\ de\ Diluição \times 0.05453\ (absortividade)}$$

Eq.7

$$Factor\ de\ Diluição = \frac{g_{clorofila}}{g_{clorofila} + g_{solvente}}$$

Eq.8

Onde: L – comprimento da cuvette (mm). No caso de não haver diluição considera-se que o fator de diluição é igual a 1

VI.3 – Validação do Método

A validação de uma metodologia analítica é um dos procedimentos básicos em sistemas de qualidade e integra programas de boas práticas de laboratório, visando assegurar que o método

utilizado é adequado ao que se pretende identificar ou quantificar. Uma metodologia analítica deve ter praticabilidade, ou seja, deve ser capaz de analisar um número significativo de amostras, em pouco tempo e com custo reduzido (Reis, 2006).

Assim, o objetivo principal da validação de um método analítico é demonstrar que o mesmo é adequado para o fim proposto, no caso em estudo para a medição de clorofila em óleos alimentares, que o método é de confiança e os resultados fiáveis.

De modo geral, a validação deverá ser feita quando:

- É desenvolvida uma nova metodologia analítica;
- Uma metodologia já empregue é reavaliada e ajustada a novos parâmetros;
- Existe alteração significativa dos resultados com o passar do tempo;
- A metodologia analítica já utilizada vai ser realizada por um novo analista ou um novo equipamento;
- Para demonstrar a igualdade entre dois métodos (Reis, 2006).

Este tipo de ação visa diminuir ou controlar fatores que poderão levar à imprecisão ou inexactidão de um resultado obtido, como variabilidade de amostras, contaminações, uso de reagentes inadequados, pipetagem errada, variações de temperatura, variações e descuidos na manutenção dos equipamentos, além de calibração ineficiente, analista não preparado para a tarefa ou perdas durante a análise. Os estudos de validação devem ser representativos, ou seja, devem ser conduzidos em condições próximas às de uso normal do método, cobrir as gamas de concentração e os tipos de amostras rotineiras (Reis, 2006).

A validação do método de ensaio deve compreender 4 etapas diferentes: o planeamento das análises, a realização das análises, a interpretação dos resultados e a documentação dos dados obtidos (Reis, 2006).

A primeira etapa deve definir quais as características de desempenho que se aplicam ao procedimento, e quais as necessidades e disponibilidade de dinheiro a ser gasto no processo. O planeamento de uma validação pode reduzir o número de análises e aumentar a qualidade dos resultados. Devem também ser definidos: a aplicação e o objetivo do método, as características de desempenho, os parâmetros de aceitação e os procedimentos operacionais para a validação (Reis, 2006).

Para definir as características de desempenho de uma validação podem ser usados materiais de referência certificados, padrões comprados de laboratórios já com uma concentração pré-definida e garantida de analito, ou usar matrizes brancas adicionadas de analito em concentrações definidas (Reis, 2006).

A validação deve ser claramente documentada e sem ambiguidades, pois a metodologia depois de validade deve ser procedida sempre da mesma forma, sem nenhuma mudança de conduta, de forma a minimizar a introdução de variação acidental no método (Reis, 2006).

Após a validação da metodologia analítica é necessário que amostras de concentrações conhecidas e padrões sejam analisados frequentemente como controlo de qualidade, pois as análises de rotina contêm concentrações desconhecidas que não permitem avaliar a eficiência e precisão do método (Reis, 2006).

VI.3.1 - Características de Desempenho

As características de desempenho comumente usadas na validação de uma metodologia analítica são: Especificidade/Seletividade; Estabilidade das Soluções; Linearidade; Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), limites de deteção e quantificação, Exatidão e Robustez (Ferreira, 2013).

VI.3.1.1 – Seletividade

A Seletividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes. Diz-se que um método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito (Castro, 2000).

Os interferentes da análise poderão ser: compostos adicionados, produto de degradação, impurezas do processo, compostos de síntese, solventes residuais, extratáveis da embalagem, etc; solventes utilizados em laboratório; ou compostos provenientes do tratamento da amostra (Ferreira, 2013).

Para avaliar as interferências poder-se-á realizar um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. Convém que as amostras sejam realizadas em duplicado e em condições de repetibilidade (Castro, 2000).

VI.3.3.2 – Linearidade (Curva de Calibração)

A linearidade é a habilidade do método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito existente nas amostras, numa determinada gama de trabalho. Esta característica mede a proporcionalidade entre a concentração do analito ou concentração verdadeira com o resultado obtido nas análises. Não basta que a concentração

realmente existente na amostra seja proporcional ao valor encontrado na análise, mas que a curva-padrão tenha repetibilidade constante (Reis, 2006).

Para a correta determinação da linearidade é necessário no mínimo (Ferreira, 2013):

- 5 Níveis de concentração;
- Concentrações igualmente distribuídas ao longo da gama de trabalho;
- Padrões preparados no mesmo meio que a amostra;
- 30 Observações:
 - Uma Solução-Mãe: 5 níveis de concentração de analito diferentes com 6 leituras por nível;
 - Três Soluções-Mãe: 5 níveis de concentração de analito diferentes com 2 leituras por nível de cada solução preparada a partir da correspondente solução-mãe;
- Soluções preparadas de modo a se realizar 3 ensaios de linearidade independentes.

No estudo da linearidade existe uma grandeza aleatória, chamada de sinal, sendo esta no nosso caso a absorvância, e uma grandeza controlada, no nosso caso a concentração de clorofila. Assim, o valor de r , conhecido por ser o coeficiente de correlação de duas variáveis aleatórias, não possui interpretação pois uma das grandezas é controlada. Deste modo a qualidade da reta é dada pelo coeficiente de determinação r^2 . Este coeficiente mede a fração da variância de y que é explicada pela reta de regressão linear. A variância dos valores experimentais de y é composta por duas parcelas (Ferreira, 2013):

- Variância não explicada pelo modelo linear – a variância residual que é independente dos valores de x e que mede a dispersão dos valores de y em torno da reta de regressão;
- Variância explicada pelo modelo linear – a variância das ordenadas y da reta de ajustamento e, por consequência, dependente de x .

A forma algébrica da equação de uma reta é dada por:

$$y = a + b x$$

Eq.9

Onde a representa a ordenada na origem e b o declive da reta.

A reta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes (x,y) . O coeficiente de correlação linear (r) e o coeficiente de determinação (r^2) são usados para indicar o quanto a reta pode ser adequada como modelo matemático e o critério mínimo aceitável do coeficiente de determinação varia entre os guias de validação de 0,90 a 1 (Reis, 2006).

$$\text{Coeficiente Angular } (b) = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum(x_i - \bar{x})^2}$$

Eq.10

$$\text{Coeficiente Linear } (a) = \bar{y} - b\bar{x}$$

Eq.11

Onde: \bar{y} – Média dos valores de y; \bar{x} – Média dos valores de x

Estes coeficientes dão uma estimativa verdadeira da função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual da reta de regressão, calculado através da ferramenta de análise estatística do Excel. Este desvio exprime a dispersão dos valores do sinal em torno da curva de calibração. O desvio padrão residual $S_{y/x}$ (Ferreira, 2013):

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum[y_i - (a + bx_i)]^2}{n - 2}}$$

Eq.12

Onde: a – coeficiente linear; b- coeficiente angular; n – número de ensaios realizados

Foi também feita a Anova – Análise de Variância, onde:

- df – graus de liberdade;
- SS – Soma dos Quadrados
- MS – Média dos Quadrados ou Variância estimada
- F – Se o valor de $F > F$ tablado então deve-se rejeitar a hipótese de não linearidade
- F de significância é igual ao valor de p, e traduz uma probabilidade estimada de rejeitar a hipótese nula (H_0) quando esta hipótese é verdadeira. Quanto mais pequeno foi o F de significância melhor o modelo, menor é a probabilidade de ocorrerem situações extremas de não linearidade (Ferreira, 2013).

O desvio padrão da ordenada na origem e do declive, são calculados através das seguintes expressões (Ferreira, 2013):

$$S_a(\text{origem}) = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \cdot \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Eq.12

Onde: $S_{y/x}$ – desvio padrão residual; n – número de ensaios realizados; \bar{x} – Média dos valores de x

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Eq.13

Onde: $S_{y/x}$ – desvio padrão residual; \bar{x} – Média dos valores de x

A partir da função polinomial ($y = a+bx$) que será calculada no capítulo da linearidade pode-se determinar a concentração da amostra. Assim a incerteza do resultando analítico é a combinação da incerteza associada à determinação do verdadeiro valor e da incerteza associada aos coeficientes de regressão. Para cada valor da concentração existe um intervalo de confiança do verdadeiro valor de y. (Ferreira, 2013)

O desvio padrão do método (S_m) é uma característica que permite ao analista verificar a qualidade do seu trabalho (Castro, 2000):

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b}$$

Eq.14

Onde: $S_{y/x}$ – desvio padrão residual; b – Coeficiente Angular

O coeficiente de variação do método, CV_m , expresso em %, é dado por (Castro, 2000):

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \cdot 100$$

Eq.15

Onde: S_m – Desvio Padrão do Método; \bar{x} – Média dos valores de x

VI.3.3.3 – Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É importante salientar que será mais realista estudar preferencialmente a precisão sobre amostras, para minimizar efeitos de matriz (Castro, 2000).

Consideram-se 3 níveis de precisão: Repetibilidade (equipamento e do método), Precisão Intermédia e Reprodutibilidade (Ferreira, 2013). Contudo os dois níveis mais comuns de avaliar a precisão de um método de ensaio são através da Repetibilidade e da Reprodutibilidade. A repetibilidade avalia a variabilidade de resposta esperada quando um método é executado por

um só analista, com um só procedimento, em um só equipamento e local, num curto período de tempo. Já a reprodutibilidade é usada em validações intra e interlaboratoriais, quando um método vai ser executado por diferentes analistas, por mais de um equipamento e/ou em diferentes (Reis, 2006).

VI.3.3.3.1 - Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possíveis, tais como: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e em curtos intervalos de tempo. (Castro, 2000)

A repetibilidade do método consiste em analisar num curto espaço de tempo diferentes alíquotas de uma amostra homogênea, cada uma delas preparada e processada de maneira independente. Sendo que por concentração deverão ser processadas e analisadas 3 réplicas independentes. (Ferreira, 2013)

A estimativa da variação (S^2) de um método de análise pode ser determinada pela média ponderada das estimativas das variações de w séries de análises estudadas nas condições de repetibilidade. Tendo em conta que a repetibilidade pode variar com o teor do elemento a dosear, esta última condições assegura, em princípio, a igualdade estatística das variações de w séries de análise. Assim, a variância associada à repetibilidade do método de ensaio, para cada nível i de concentração é (Castro, 2000):

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1) \cdot S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi} - 1)}$$

Eq.16

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) é avaliado segundo (Castro, 2000):

$$r = 2,8 \cdot \sqrt{S_{ri}^2}$$

Eq.17

O coeficiente de Variação de Repetibilidade (CV_r), para cada nível de concentrações, expresso em percentagem, é dado por (Castro, 2000):

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \cdot 100$$

Eq.18

VI.3.3.3.2 – Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como: diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos e/ou diferentes épocas (Castro, 2000).

O estudo da precisão intermédia pode ser substituído pelo estudo da reprodutibilidade (Ferreira, 2013).

O limite de reprodutividade é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre os dois resultados de ensaio, obtidos nas condições referidas. (Castro, 2000)

A reprodutibilidade é obtida a partir de ensaios de uma série de amostras aos p analistas, os quais realizam ensaios sobre a mesma amostra. (Castro, 2000)

O valor da variância associada à reprodutibilidade é calculado do seguinte modo (Castro, 2000):

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2$$

Eq.19

Sendo S_{Ri}^2 – Variância de reprodutibilidade; S_{Li}^2 – Variância interanalista; e S_{ri}^2 – Variância da repetibilidade.

$$S_{Li}^2 = \frac{S_{di}^2 - S_{ri}^2}{\bar{n}_i}$$

Eq.20

$$S_{di}^2 = \frac{1}{p-1} \cdot \sum_{w=1}^p n_{wi} \cdot (\bar{n}_{wi} - \bar{\bar{x}}_i)^2$$

Eq.21

$$\bar{\bar{n}}_i = \frac{1}{p-1} \cdot \left[\sum_{wi=1}^p n_{wi} - \frac{\sum_{w=1}^p n_{wi}^2}{\sum_{w=1}^p n_{wi}} \right]$$

Eq.22

Sendo S_{ri}^2 – Variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório; n_{wi} – nº de ensaio efetuado pelo analista para um determinado nível de concentrações; p – nº de analistas participantes; $\bar{\bar{x}}_i$ – Média aritmética dada pelo analista para uma determinada nível de concentração.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de reprodutibilidade é avaliado segundo (Castro, 2000):

$$R = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_{Ri}$$

Eq. 23

O Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade (CV_R), expresso em percentagem, é dado por (Castro, 2000):

$$CV_R = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \cdot 100$$

Eq.23

VI.3.4 – Exatidão

A forma de avaliação deste parâmetro baseia-se na comparação do resultado obtido com o verdadeiro valor sendo o analito um analito de referência com concentração conhecida. (Ferreira, 2013)

A exatidão de um método, ou de um resultado, está condicionada pela existência de erros sistemáticos, que se manifestam sempre da mesma maneira, para um dado conjunto de ensaios independentes. Os erros sistemáticos obedecem a causas determinadas e podem ser classificados em três categorias: erros instrumentais, onde estão incluídas a má calibração do material e as avarias parciais do equipamento; erros operativos, onde são incluídos alguns erros dos analistas e erros de método, associados a interferências de ordem variada, à existência de reações secundárias no processo analítico (Ribeiro, 2006).

Para o cálculo da exatidão foi utilizado um analito de referência, sendo feita a fortificação a uma matriz sem analito.

As quantidades adicionadas foram:

- 0,1 mg de clorofila em 10 ml de diclorometano;
- 0,2 mg de clorofila em 10 ml de diclorometano;
- 0,2 mg de clorofila em 5 ml de diclorometano

VI.3.5 - Limites de Detecção e Quantificação

A estimativa destes parâmetros é ainda objeto de discussão, não havendo para o seu cálculo um método devidamente uniformizado. Contudo, encontram-se disponíveis vários tipos de modelos passíveis de serem usados na determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) (Ribeiro, 2006).

Em termos qualitativos, o conceito de limite de detecção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, ou seja, de uma amostra que contém a mesma matriz mas não contém o analito. Este limite corresponde ao início em que é possível distinguir com confiança estatística (95%) o sinal do branco do sinal de amostra, sendo possível indicar se o analito está ou não presente (Castro, 2000).

O Limite de Quantificação corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão (Castro, 2000).

Existem dois tipos de análise para o cálculo dos limites de detecção (Ferreira, 2013):

- Se a análise não produz um registo contínuo, como por exemplo a medição de absorvâncias, o limite de detecção é estimado a partir dos valores discretos obtidos;
- Se a análise produz um registo contínuo, como por exemplo a cromatografia, o limite de detecção é estimado a partir da amplitude do ruído.

No caso da espectroscopia UV deverá efetuar-se n leituras de um branco ($n > 20$) e calcular-se o respetivo desvio padrão (Ferreira, 2013).

Os limites de detecção foram estimados considerando as seguintes expressões:

$$LD = x_0 + 3.3 \times s_0$$

Eq. 24

Onde: x_0 – média aritmética do teor medido de uma série de brancos, onde $n > 20$; s_0 – desvio padrão dos brancos.

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada com uma precisão e exatidão aceitáveis.

$$LQ = x_0 + 10 \times s_0$$

Eq.25

Onde: x_0 – média aritmética do teor medido de uma série de brancos, onde $n > 20$; s_0 – desvio padrão dos brancos.

Na determinação dos limites de detecção e de quantificação, nos vários métodos usados e para cada elemento estudado, foram efetuados, 30 ensaios com um branco representativo (ensaios preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias).

VI.3.6 - Estabilidade da Amostra

É necessário haver um estudo que evidencie a estabilidade das soluções durante o tempo necessário à análise, quer do padrão quer do produto final, incluindo o armazenamento à temperatura ambiente e em frigorífico (Ferreira, 2013).

Este estudo deverá ser feito durante um período mínimo de 24 horas e se os resultados mostrarem que ao fim deste tempo as soluções ensaiadas não são estáveis, terá de ser planeado um estudo para o período de tempo mais curto de modo a determinar a estabilidade adequada das soluções sendo o ideal de 72 horas (Ferreira, 2013).

Deve-se conhecer a estabilidade da amostra a ser analisada, pois usando-se analitos instáveis perde-se parte da concentração da amostra durante a preparação ou armazenamento, não apresentando a análise um valor real de concentração do analito. As condições de armazenamento de uma amostra devem ser monitoradas para determinar sua estabilidade.

Assim, foi feita uma solução-padrão de clorofila com 10ppm que foi analisada no momento após a preparação, e 24 horas após a sua primeira análise, a diversas concentrações.

VI.3.7 – Gama

A gama de trabalho é o intervalo em que o método providencia um nível aceitável de linearidade, precisão e exatidão (Ferreira, 2013).

A gama é definida como o intervalo compreendido entre os limites inferior e superior correspondentes à concentração do analito na amostra (incluindo aquelas concentrações), e para o qual se demonstra que o método analítico tem um nível adequado de linearidade, exatidão e precisão. Sendo que na prática, é determinada utilizando os dados de exatidão, linearidade e precisão obtidos (Ferreira, 2013).

Desta forma, foi considerada como gama de trabalho de 0 a 40 ppm, de forma a incluir qualquer valor de clorofila existente em óleos vegetais.

VI.3.8 – Robustez

Um método diz-se robusto se for insensível a pequenas variações em alguns parâmetros (Ferreira, 2013).

Este estudo pode ser efetuado com uma amostra ou fortificando a matriz de uma amostra com o analito em estudo, e deverá ter-se em particular atenção o processo de tratamento da amostra,

nomeadamente se o mesmo inclui operações de extração, centrifugação e filtrações (Ferreira, 2013).

Foi visto anteriormente que o óleo testado por espectroscopia possui estabilidade após a sua extração sem sofrer qualquer degradação de compostos que possam levar a interferência na análise da clorofila. Para além da possibilidade de degradação do óleo vegetal a ser analisado são raros os procedimentos que poderão causar interferência na determinação da clorofila.

Contudo, durante os diversos testes feitos ao longo deste projeto houve sempre um enorme cuidado em agitar e homogeneizar a garrafa do óleo vegetal cru antes de este ser colocado na cuvete para análise pois nota-se uma leve predisposição para a formação de uma camada mais densa de óleo na base do recipiente de armazenamento (enquanto espera análise), geralmente formada por impurezas presentes no óleo cru.

VI.4 – Lovibond

No decorrer deste projeto, procedeu-se à aferição de um novo equipamento (Lovibond Série PFX995/950) adquirido pela empresa. Para a concretização da aferição deste equipamento, procedeu-se à comparação e validação dos resultados obtidos pelo novo equipamento com os dos métodos referidos anteriormente (Espectrofotometro Hitachi U-2800).

Este novo aparelho, ao contrário do equipamento usado anteriormente, possui um sistema de calibração automático e fornece como resultado final, não os valores das absorvâncias mas sim a concentração final de clorofila presente na amostra, não sendo necessário qualquer cálculo adicional.

VII - Materiais e Métodos

VII.1 – Espectroscopia / Comparação dos Métodos de Quantificação de Clorofila

VII.1.1 – Material

O material utilizado na comparação dos métodos para a quantificação de clorofila foi o seguinte:

- Espectrofotômetro (Hitachi Modelo U-2800 *Double-beam*);
- Cuvetes quartzo (1cm);
- Diclorometano (Fisher Scientific, Analytical reagent grade);
- Ácido acético Glacial (Fisher Scientific, Analytical reagent grade);
- Padrão de Clorofila a (Sigma-Aldrich CAS:479-61-8 C6144-5MG)
- Material corrente de laboratório

VII.1.2 – Método de Preparação das Soluções Padrão

Esta comparação foi feita com base num documento interno de Instrução de Trabalho da empresa que não cobre toda a gama de trabalho que sofrerá validação estatística.

O método utilizado na preparação das soluções-padrão segue o procedimento interno:

- Preparar uma solução de aproximadamente 10 ppm pesando 1mg do padrão de clorofila a pura que é transferida para um balão volumétrico de 100ml;
- Encher até meio com diclorometano, e depois adicionar 1ml de ácido acético glacial. Agitar suavemente durante 2 minutos, e preencher o restante volume com diclorometano;
- A partir da solução anterior preparar diferentes concentrações de solução de clorofila. Neste projeto foram preparadas soluções com as seguintes concentrações: 5ppm; 4ppm; 3ppm; 2ppm; 1,5ppm; 1ppm; 0,5ppm; 0,100ppm; 0,050ppm e 0,010ppm, utilizando volumes adequados e diclorometano;
- Obter as leituras de absorvâncias nos seguintes comprimentos de onda: 630, 662, 668,, 670, 672 e 710nm. Usar diclorometano como branco;
- Calcular o teor em clorofila através das fórmulas dadas por cada método.

A gama usada para esta comparação é de 0,010ppm até 10ppm, e apesar de não cobrir toda a gama de trabalho considerada na validação estatística, foi possível retirar conclusões concretas da escolha do método.

VII.1.3 – Obtenção das Absorvâncias

A aquisição das absorvâncias é realizada em dois passos. O primeiro é a criação da *Baseline* com o auxílio do branco. Este passo consiste em acertar a absorvância para o valor de 0 de forma a ser possível comparar a amostra a analisar com a referência (branco). Para tal devem ser seguidas as instruções do equipamento e que envolvem o enchimento das cuvetes com Diclorometano puro. É necessário especial cuidado na limpeza das células pois, caso esta não seja bem executada irá influenciar o resultado final.

De seguida, retira-se a cuvete destinada à amostra que queremos analisar, lava-se com acetona e seca-se. A solução a analisar é colocada na cuvete com a ajuda de uma pipeta de Pasteur. A quantidade a transferir deve ocupar no mínimo cerca de 70% da altura da cuvete. Colocar novamente a cuvete no local apropriado do equipamento e fazer a medição. Regista-se o valor das absorvâncias indicado no ecrã no equipamento.

VII.2 – Espectroscopia / Validação do Método

VII.2.1 – Material Utilizado

- Espectrofotómetro (Hitachi Modelo U-2800 *Double-beam*);
- Cuvetes de quartzo (1cm);
- Diclorometano (Fisher Scientific, Analytical reagent grade);
- Ácido Acético Glacial (Fisher Scientific, Analytical reagent grade);
- Padrão de Clorofila a (Sigma-Aldrich CAS:479-61-8 C6144-5MG)
- Material corrente de laboratório

VII.2.2 – Método de Preparação das Soluções-Padrão

O método utilizado na preparação das soluções-padrão segue o procedimento interno:

Preparar uma solução-padrão de 1mg de clorofila a em 25ml de diclorometano, correspondente a 40ppm:

- Pesar 1mg de clorofila a e dissolve-la num pouco de diclorometano;
- Adicionar 1 ml de ácido acético glacial e agitar durante 2 minutos para que ocorra a reação;
- Aferir o restante balão de 25 ml com diclorometano;

- Preparar diferentes diluições, partindo da solução padrão. Foram preparadas as seguintes diluições: 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25 ppm, usando volumes adequados e Diclorometano;
- Obter as leituras de absorvâncias nos seguintes comprimentos de onda: 630, 662, 668,, 670, 672 e 710nm. Diclorometano é usado como branco;
- Calcular o teor em clorofila através das fórmulas dadas por cada método.

VII.2.4 – Obtenção das Absorvâncias

As absorvâncias foram obtidas de forma idêntica e descrita no Capítulo VII.1.3 – Obtenção das Absorvâncias.

VII.2.3 – Obtenção das Amostras de Óleo

As amostras de Óleo Cru de Colza e Soja, e de Óleo Refinado foram obtidas pelos operários da fábrica e entregues no laboratório em garrafas de vidro castanho de 250ml. Este óleo foi guardado à temperatura ambiente no laboratório e longe da luz solar direta.

VII.3 – Ensaios de Branqueamento

VII.3.1 – Material Utilizado

- Espectrofotômetro (Hitachi Modelo U-2800 *Double-beam*);
- Cuvetes de quartzo (1cm);
- Balões Tribulados de 1L;
- 2 Placas de Aquecimento;
- 2 Termômetros;
- Agitadores Magnéticos;
- Sistema de Vácuo;
- Filtros de poros finos (7cm ø);
- Kitasato;
- Funil de Buckner
- Material Corrente de Laboratório
- Terras de Branqueamento (Tonsil 272; Fornecedor: Clariant)

VII.3.1 – Obtenção de óleo de Lavado

Para este estudo foram utilizadas amostras de óleo lavado retirado diretamente da última centrífuga da etapa de lavagem do processo de refinação de óleo, estando dessa forma preparado para a etapa de branqueamento. As garrafas para o transporte do óleo eram garrafas de dois litros, de plástico opaco.

Ao mesmo tempo que se retirava o óleo Lavado, retirava-se também uma amostra de óleo cru no qual se analisou o teor em clorofila, sendo este valor considerado como a quantidade inicial de clorofila antes de entrar no branqueador.

VII.3.2 – Obtenção das Terras de Branqueamento

Estas foram retiradas diretamente do depósito onde se encontram as terras que serão utilizadas na Sovena na fase de Branqueamento. Apresentam uma cor cinzenta e na forma de um pó fino. Não necessitaram de nenhum acondicionamento especial para além de serem afastadas da luz solar direta.

VII.3.4 – Método Utilizado

O método utilizado foi o seguinte:

1. Pesar para o balão tribulado 450g de óleo lavado;
2. Adaptar um termómetro ao balão e aquecer com agitação até à temperatura pretendida;
3. Enquanto o óleo do balão aquece, pesar 50g de óleo lavado para o copo de 80 ml e aquecer com agitação;
4. Pesar a quantidade de terras pretendida para o ensaio;
5. Quando o óleo do copo chegar aos 70°C adicionar as terras de branqueamento mantendo a agitação;
6. Estabilizar o balão na temperatura pretendida e adicionar o óleo com as terras ao balão;
7. Ligar o vácuo ao balão;
8. Manter a temperatura desejada durante o tempo pretendido, ligando ou desligando a placa de acordo com o necessário;
9. Quando o branqueamento terminar, procede-se à filtração sob vácuo, separando-se desta forma o óleo branqueado das terras de branqueamento;
10. Recolhe-se o óleo para um frasco, sendo este devidamente acondicionado;
11. Realização das análises

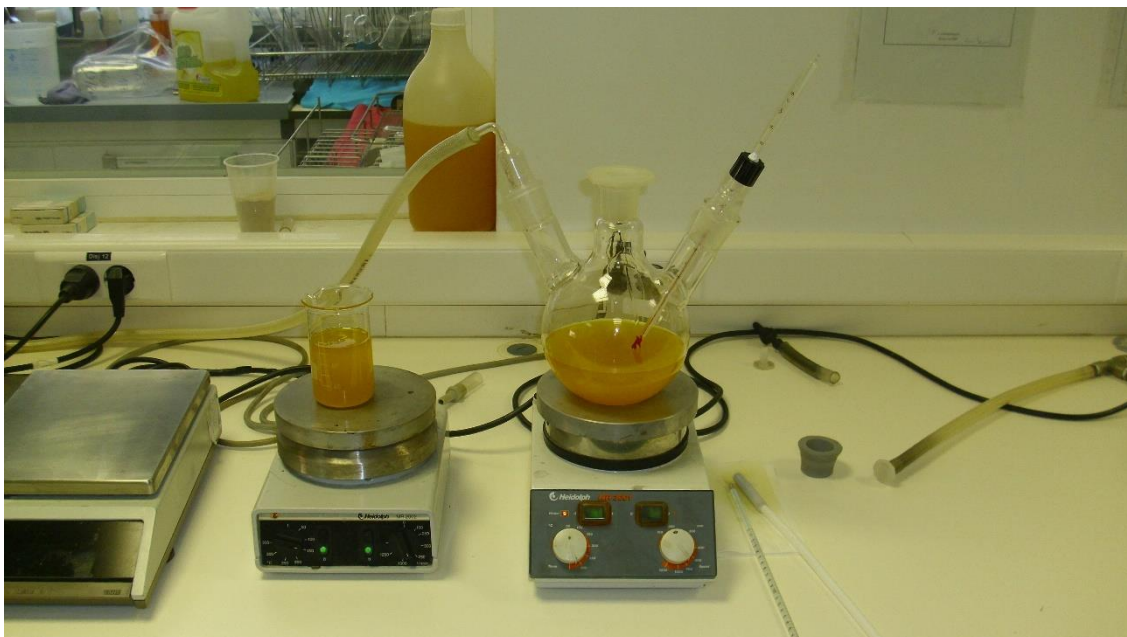


Figura 7.1 - Aparato Experimental

VII.3.5 – Análises Laboratoriais

Após a realização dos ensaios laboratoriais de branqueamento, procedeu-se à análise do óleo branqueado. As amostras foram guardadas longe da luz solar direta e de grandes variações de temperatura sendo as análises efetuadas no dia posterior aos ensaios.

A obtenção do valor das absorvâncias foi idêntica ao descrito Capítulo VII.1.3 – Obtenção das Absorvâncias.

VIII – Apresentação e Discussão de Resultados

VIII.1 – Análise do Método de Determinação de Clorofila

Observando os valores obtidos em cada um dos métodos com os valores esperados (valores das soluções padrão) podemos observar que o Método usado atualmente pela Sovena é o que se aproxima mais do valor real em comparação com os restantes, como pode ser observado na Tabela 8.1.

Tabela 8.1 - Médias dos diversos métodos de quantificação da clorofila para comparação

Clorofila Padrão (ppb)	Métodos (valor do teor de clorofila em ppb)		
	AOCS 13i-96	BFM 0a-8	Sovena
10	0	4	3
50	46	33	24
100	270	104	78
500	782	597	446
1000	1628	1199	896
1500	2417	1808	1351
2000	3217	2401	1794
3000	4816	3588	2681
4000	6710	4975	3717
5000	8074	5985	4472
10000	16119	11966	8942

Relativamente ao método, AOCS Cc 13d-55, não foi possível obter qualquer tipo de resultado devido à impossibilidade de encontrar a constante F que acompanha o aparelho e é referente ao fator específico de cada espectrofotómetro. Assim a comparação entre os métodos só pode ser feita aos métodos apresentados na tabela 3.

Como pode ser observado o Método AOCS 13i-96, a partir de 50ppb os valores experimentais deixam de apresentar valores aproximados aos da solução-padrão, podendo, devido a este facto, ser excluído para futura validação e utilização.

Resta assim o método BFM 0a-8 e o Método utilizado na Sovena presentemente. Sendo o Método Sovena um ajuste do Método BFM 0a-8, pode-se concluir que quando a empresa adquiriu o equipamento o ajuste foi feito com sucesso pois como pode ser visto o método utilizado na empresa apresenta valores mais aproximados do real do que os apresentados no método original.

Conclui-se portanto que o método usado pela Sovena atualmente aproxima-se do valor real e que Método BFM 0a-8 é o método mais fiável mas necessitando de novo ajuste e validação.

VIII.2 – Validação do Método

VIII.2.1 – Linearidade da Curva de Calibração do espectrofotómetro para medição da clorofila

O objetivo da avaliação da linearidade é o de verificar se existe proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta observada no espectrofotómetro.

Nesta avaliação foram medidas soluções-padrão de clorofila. Efetuou-se a representação num gráfico xy (Fig. 8.1) com 7 pontos, correspondendo às concentrações de 40; 20; 10; 5; 2,5; 2; 1; 0,5 e 0,5 ppm, analisadas em triplicado. Foram determinados, por regressão linear, a equação da curva e o coeficiente de extinção molar da clorofila. Tais parâmetros são apresentados no gráfico seguinte.

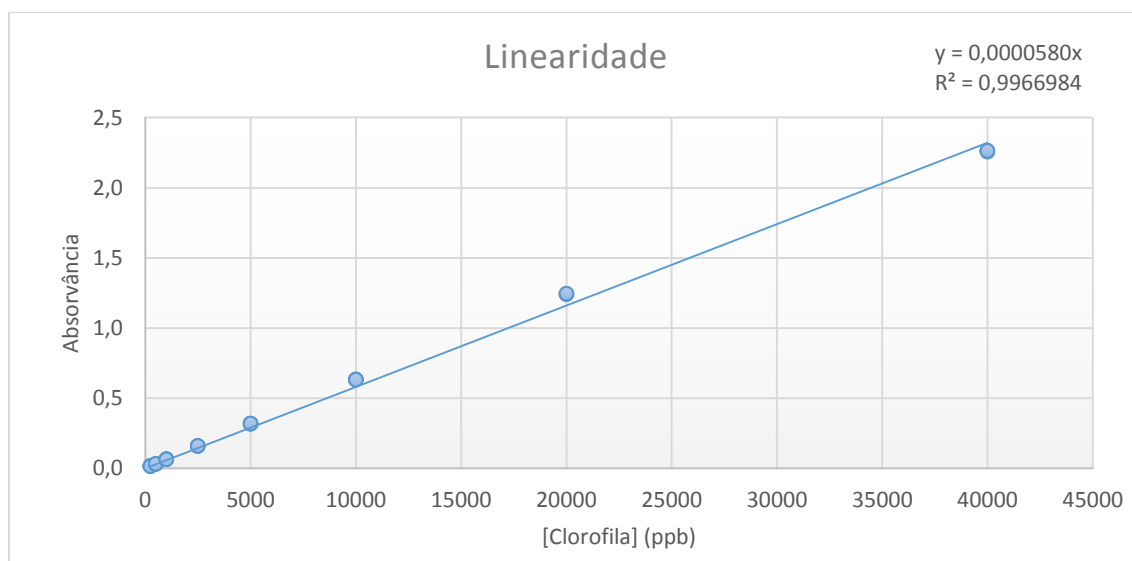


Figura 8.1 – Correlação da absorvância da clorofila

Para que possa existir uma faixa linear utilizável, deverá ser obtido um coeficiente de correlação de cerca de 0,98, no mínimo (Chasin, et al., 1998). O valor obtido um valor r^2 considera-se satisfatório, significando que o modelo aplicado explica 99.66% da variância total.

Foram também calculados outros parâmetros que complementam a análise anterior e confirmam que a reta de calibração foi bem executada.

O desvio padrão residual correspondente obtido através da equação 1:

$$S_{y/x} = 0.0377$$

Da análise Anova – Análise da Variância realizada com o auxílio de folha de cálculo de Excel foi possível observar que tendo F igual a 18524, para um valor de F tablado igual a 4,052, pode-se rejeitar a hipótese de não-linearidade pois, $F > F_{\text{tablado}}$, ou seja, existe linearidade no estudo em questão. Para além disso, o $F_{\text{significância}}$ é quase nulo o que indica que existe uma probabilidade quase nula de ocorrerem situações extremas de não linearidade.

O coeficiente linear (a) e o Coeficiente Angular (b) da curva da reta apresentaram os valores de, calculados a partir das Equações 10 e 11, respetivamente:

$$\text{Coeficiente Linear (a)} = 0$$

$$\text{Coeficiente Angular (b)} = 0,000058$$

Sendo que o valor do coeficiente angular de 0,000057 permite obter o resultado da concentração de clorofila em ppm. No caso de se querer o resultado em ppb basta alterar este valor para 0,057.

O desvio padrão da ordenada na origem e do declive foram obtidos através das equações 12 e 13, respetivamente:

$$S_a(\text{origem}) = 0,00684$$

$$S_b = 4.192 * 10^{-7}$$

O desvio padrão do método calculado através da Eq.14 foi de:

$$S_m = 649,87$$

O coeficiente de variação do método, CV_m , expresso em % e calculado através da Eq.15, foi de:

$$CV_m = 6,56\%$$

VIII.2.2 – Precisão

VIII.2.2.1 – Repetibilidade

A variância associada à repetibilidade do método de ensaio, calculado através da Eq.16, foi:

$$S_{ri}^2 = 45,9$$

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) obtido, através da Eq. 17, foi de:

$$r = 18,97$$

O coeficiente de Variação de Repetibilidade (CV_r), para cada nível de concentrações, expresso em percentagem e calculado através da Eq.18, é dado por:

$$CV_r = 0,3\%$$

VIII.2.2.2 - Reprodutibilidade

O valor da variância associada à reprodutibilidade calculado através da Eq.19:

$$S_{Ri}^2 = 4.59$$

Os cálculos intermédios foram calculados através das equações 20, 21 e 22:

$$S_{Li}^2 = 0$$

$$S_{di}^2 = 8,57$$

$$\bar{n}_l = 10$$

Para um nível de confiança de 95%, o limite de reprodutibilidade é avaliado segundo a Eq.23:

$$R = 12,72$$

O Coeficiente de Variação de Reprodutibilidade (CV_R), expresso em percentagem, é obtido através da Eq.24:

$$CV_R = 0,3\%$$

VII.2.3 – Exatidão

Na tabela 8.2 encontram-se os valores de recuperação obtidos no teste de exatidão.

Tabela 8.2 - Exatidão

[Clorofila] (ppb)	Recuperação (%)
10000	101
20000	107
40000	98

O intervalo aceitável para os valores de exatidão (%) situam-se no intervalo de 80% a 110%, portanto pode ser concluído que este método de quantificação de clorofila possui uma boa exatidão contudo é preciso notar que a exatidão depende do ajuste feito pelo analista, ao contrário, por exemplo, da precisão que depende unicamente do aparelho no qual é feita a análise.

VIII.2.4 – Limites de Detecção e Quantificação

Para a definição dos limites de Detecção e Quantificação foram realizados cálculos onde a média dos valores obtidos para o branco (30 análises) foram de:

Tabela 8.3 - Média e Desvio Padrão do conjunto de brancos para cálculo do LQ e LD

	Média	Desvio Padrão
Clorofila (ppb)	-2,9	10,5

Os limites de detecção foram estimados considerando as Eq.24 e 25:

$$LD = 33 \text{ ppb}$$

$$LQ = 106 \text{ ppb}$$

VII.2.5 - Estabilidade

Os resultados para a estabilidade de óleo cru e óleo refinado estão apresentados nas tabelas seguintes:

Tabela 8.4 - Dados da Estabilidade ao longo do tempo de dois lotes distintos (911 e 912) de Óleo Cru de Soja

Tempo	0h		24h		72h	
Lote	911	912	911	912	911	912
[Clorofila] (ppb)	1224	1439	1218	1433	1244	1436

Tabela 8.5 - Dados de Estabilidade ao longo do tempo para Óleo Refinado

Tempo	0h	24h	72h
[Clorofila] (ppb)	1224	1218	1244

A concentração da clorofila mantém-se constante durante o período de tempo em que decorreu o ensaio, concluindo-se assim que as amostras são estáveis não ocorrendo degradação da clorofila nem o aparecimento de nenhum composto que possa interferir com a análise, no período de tempo considerado.

VIII.3 – Ensaios de Branqueamento

Numa etapa inicial, o estudo engloba, para além da aplicação das terras de branqueamento, a avaliação do efeito da variação da temperatura, tempo de contacto, quantidade de caudal de óleo de adição de terras e a que temperatura estas são adicionadas, com o objetivo de otimizar a etapa de branqueamento no processo de refinação do óleo cru de soja.

Na realização deste estudo, foram utilizadas as seguintes variáveis:

- Temperatura: 90°C, 95°C, 100°C, 105°C, 110°C e 115°C;
- Tempo de Contacto: 20min, 45min e 60 minutos;
- Quantidade de terras de branqueamento: 3 kg, 4 kg, 5 kg e 7 kg de terras para 1 tonelada de óleo;
- Percentagem de óleo para adição de terras: 10%, 15%, 20%, 25%
- Temperatura do óleo para adição de terras: 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C, 110°C, 120°C

VIII.3.1 – Tempo de Contacto

Nos ensaios foram aplicados os parâmetros base, à exceção do Tempo de Contacto, que se fez variar entre 10 minutos, 20 minutos, 45 minutos e 60 minutos. Este foi o primeiro parâmetro a ser otimizado.

Parâmetros base:

- Terras de Branqueamento: 4kg para 1 tonelada de óleo;
- Temperatura: 100 °C;
- 10% do óleo para adição de Terras a 70°C;

Espera-se que a temperaturas elevadas, possa-se registar uma diminuição da cor vermelha nos óleos até 40-60 minutos. Contudo a partir desse tempo poderão ocorrer reações de reações de degradação originado, por exemplo, aumento da cor vermelha. (Erickson, Pryde, Brekke, Mounts, & Falb, 1980)

Com o aumento do tempo de contacto, também pode ocorrer a conversão dos carotenos num outro tipo de carotenos, não são detetados a 450 nm, refletindo-se no aumento de cor. (Kaynak, Ersoz, & Kara, 2004)

Pode-se então considerar, baseado na pesquisa bibliográfica anteriormente referida, que a diminuição da concentração de pigmentos não compensa o aumento da cor vermelha.

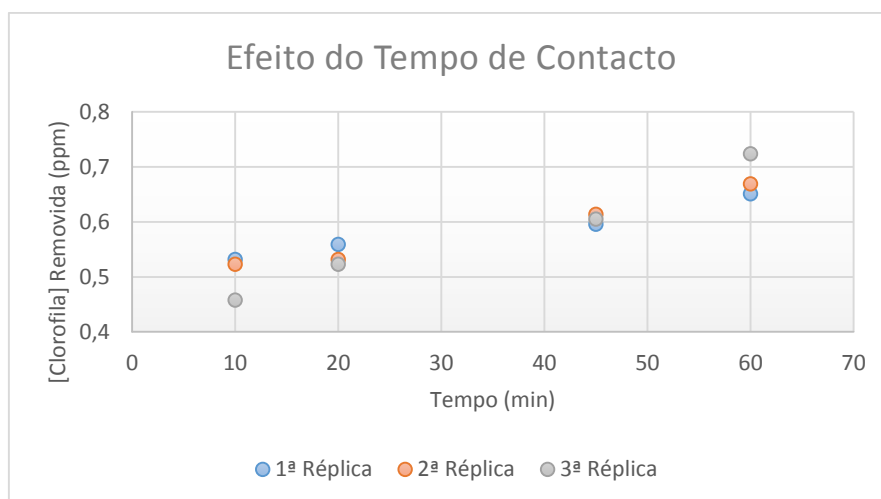


Figura 8.2 - Efeito do tempo de contacto óleo/terras, na concentração de clorofila

Os resultados obtidos através da Fig.8.2 foram de encontro aos esperados, verificando-se um aumento considerável da remoção de clorofila à medida que se ia aumentando o tempo de contacto. Através do gráfico anterior conclui-se de forma imediata que o melhor tempo de contacto é de 60 minutos. Contudo foi decidido que para os restantes ensaios de otimização iria ser usado um tempo de contacto de 20 minutos de forma a diminuir o tempo das experiências de laboratório.

De forma a complementar o estudo anterior, poderão ser feitos ensaios a tempos de contacto mais elevados de forma a confirmar a existência de um patamar de saturação das terras.

VIII.3.2 – Temperatura de Trabalho

A temperatura é uma variável importante, que determina a velocidade de adsorção do pigmento. No entanto, pode também alterar a cor do produto final, catalisando reações indesejáveis de deterioração e oxidação, a partir de um determinado tempo de contacto do óleo com o adsorvente. (Batinas, 2006)

Para o estudo do efeito da variação de temperatura, foram efetuados 6 ensaios no intervalo de temperatura de 90°C a 115°C, com um intervalo de 5°C. Nesta fase de testes, os parâmetros base foram:

- Terras de branqueamento: 4 kg para 1ton de óleo lavado;
- Tempo de Contacto: 20 Minutos;
- 10% do óleo para adição das Terras a 70°C.

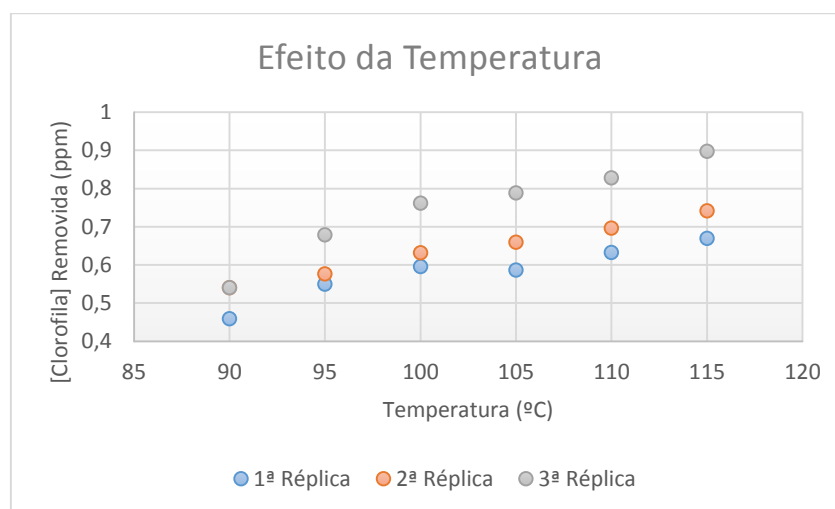


Figura 8.3 - Efeito da Variação da Temperatura de Trabalho, na concentração de clorofila

Perante os resultados obtidos, seria lógico escolher como temperatura ótima os 115°C. Contudo, o aumento da temperatura irá criar um decréscimo da acidez livre e uma tendência para o aumento do fósforo. (Batinas, 2006) Para além deste fator negativo, (Erickson, Pryde, Brekke, Mounts, & Falb, 1980) considera que as temperaturas elevadas podem causar para além de um aumento significativo da cor vermelha, provocar isomerizações.

Para complementar este estudo, poderão ser realizados testes à cor, fósforo e acidez para confirmação do referido na bibliografia, bem como para determinar qual o limite a partir do qual irá haver negativa dos parâmetros anteriormente referidos.

VIII.3.3 – Quantidade de Terras de Branqueamento Adicionadas

Nestes ensaios foram aplicados os Parâmetros Base e os já otimizados, à exceção da proporção de Terras de Branqueamento, que se fez variar nas seguintes proporções 3kg, 4kg, 5kg e 7kg para 1 tonelada de óleo lavado.

Parâmetros Base:

- Tempo de Contacto: 20 minutos
- 10% do óleo para adição das Terras a 70°C
- Temperatura de trabalho: 100°C

Com o aumento da dosagem de adsorvente tem como efeito uma diminuição considerável da concentração de clorofila presente no óleo, assim como uma diminuição na cor vermelha. (Batinas, 2006)

Os resultados obtidos são apresentados no gráfico seguinte:

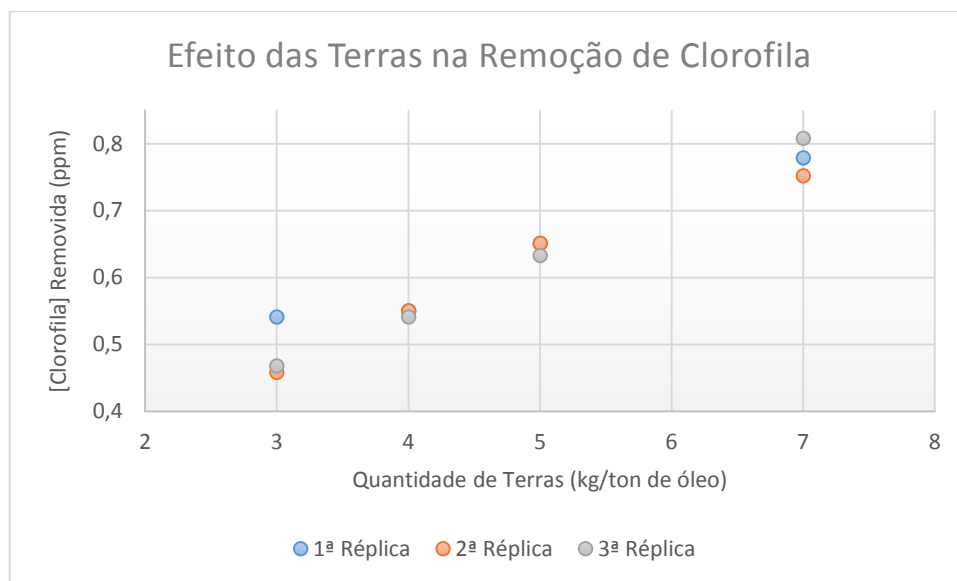


Figura 8.4 - Efeito da variação da quantidade de terras de branqueamento, na concentração de clorofila

Tal como esperado, a remoção do teor em clorofila sofre um crescimento exponencial relativamente à quantidade de terras. Apesar de ser expectável colocar a quantidade de terras suficientes de forma a remover toda a clorofila na operação de branqueamento, se levarmos em conta o custo das terras e o facto de que o carvão ativado (adicionado ao branqueador) também remover uma pequena percentagem de clorofila, utilizar os 4 kg/1ton de óleo é a opção mais razoável, sendo a que foi adotada nos ensaios seguintes. Para além do fator monetário na escolha das terras é igualmente importante referir que quanto maior a quantidade de terras adicionadas maior as perdas de óleo, pois este fica retido no interior das terras quando estas são filtradas.

VIII.3.4 – Percentagem de Caudal de Óleo para adição das terras de branqueamento

Nestes ensaios foram aplicados os Parâmetros Base e os já selecionados, à exceção da quantidade de óleo retirada do caudal principal para adição de terras, que se fez variar nas seguintes percentagens: 10%, 15%, 20% e 25%.

Parâmetros Base:

- Tempo de Contacto: 20 minutos;
- Óleo para adição das Terras de branqueamento a 70°C;
- Temperatura de trabalho: 100°C
- 4kg de terras para 1 tonelada de óleo

Como referido anteriormente, parte do caudal de óleo dito principal é retirado, ao qual serão adicionadas as terras de branqueamento. Este caudal será referido como caudal de hidratação pois tem como função ativar e hidratar as terras de branqueamento a uma temperatura mais baixa que a do branqueamento. Este pormenor da adição a uma temperatura mais reduzida é um fator importante pois, segundo a bibliografia estudada, foi referido que as terras colapsam se foram adicionadas a um óleo com elevada temperatura. Para além disso, o óleo começa a perder humidade por volta dos 90°C, e essa humidade é importante para melhorar a eficiência das terras, sendo a temperatura de trabalho do branqueador de 100°C.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 8.5:

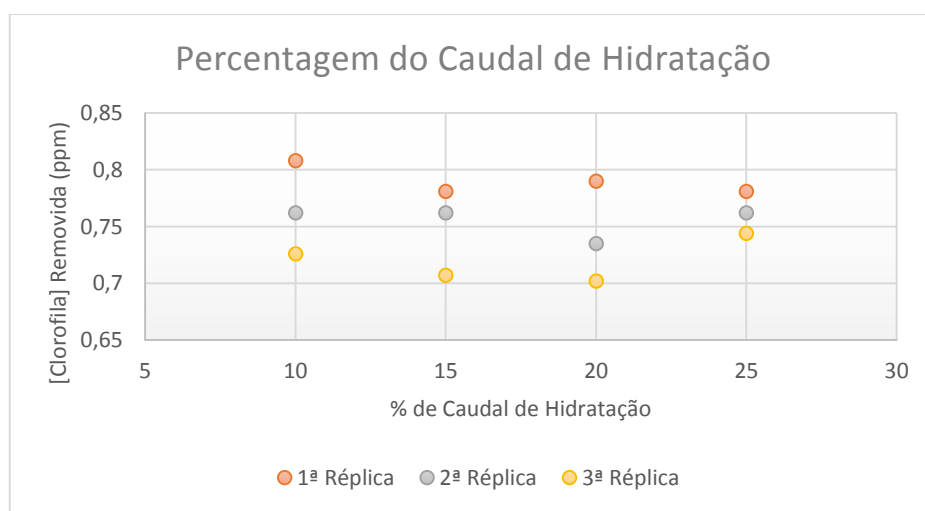


Figura 8.5 - Ensaios envolvendo alteração da percentagem de caudal de hidratação

Não foram encontradas referências ao resultado efeito estudado nestes ensaios na pesquisa bibliográfica, contudo verificou-se que, fazendo uma média dos resultados experimentais, não existe variação significativa da concentração de clorofila removida variando a % de caudal de hidratação para adição de terras de branqueamento. Assim, para os restantes ensaios foi escolhida a percentagem de 10% para o caudal de hidratação por acarretar menos custos em termos práticos.

VIII.3.5 – Variação da temperatura do Caudal de Hidratação

Este ensaio foi feito em último lugar, já com os restantes parâmetros otimizados, às seguintes temperaturas: 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C, 110°C e 120°C. Contudo, e após serem feitas as 3 réplicas como nos anteriores ensaios, concluiu-se que os resultados eram aleatórios e portanto não é reconhecido nenhum efeito claro.

Os parâmetros base usados foram os seguintes:

- Tempo de Contacto: 20 minutos;
- 10% Óleo para adição das Terras de branqueamento;
- Temperatura de trabalho: 100°C
- 4kg de terras para 1 tonelada de óleo

No entanto, esperava-se que a partir dos 90°C as terras perdessem a sua eficiência pois, a estrutura das terras colapsaria e, por outro lado, a partir dos 100°C o óleo deixaria de poder hidratar de forma eficiente as terras de branqueamento. Apesar de o primeiro ponto poder ser explicado através de uma estrutura diferente, e portanto mais resistente de forma a não colapsar com o choque térmico, das terras usadas na empresa, não foi encontrada nenhuma explicação para as terras continuarem a ter atividade após os 100°C.

VIII.4 – Lovibond

Recentemente foi adquirido pela empresa um novo equipamento para medição de cor e deteção de clorofila. Este equipamento tem como grande vantagem a rapidez dos ensaios permitindo reduzir para metade o tempo gasto em cada medição.

No entanto, foram feitos diversos testes de forma a tentar comparar os resultados do novo equipamento com o antigo (após validação do método). Como se pode constatar, a quantidade apresentada pelo Lovibond é cerca de metade da que se esperaria. Na tabela seguinte estão apresentadas medições aleatórias de óleo feitas nos testes relativos à comparação anterior.

Tabela 8.6 - Valores Lovibond e sua diferença relativa ao espectrofotómetro

id	Hitachi U-2800 (ppm)	Lovibond (ppm)	Desvio Relativo
1	0,596	0,286	47,99%
2	0,596	0,282	47,32%
3	0,569	0,273	47,98%
4	0,587	0,29	49,40%
5	0,596	0,291	48,83%
6	0,669	0,316	47,23%
7	0,55	0,27	49,09%
8	0,633	0,308	48,66%
9	0,605	0,293	48,43%
10	0,614	0,294	47,88%
11	0,633	0,305	48,18%
12	0,541	0,268	49,54%
13	0,633	0,303	47,87%
14	1,146	0,556	48,52%
15	0,66	0,314	47,58%

Também os padrões usados na validação do espectrofotômetro U-2800 tiveram os seus valores de clorofila reduzidos para aproximadamente metade quando analisada no Lovibond.

A Lovibond não permite um ajuste manual do método sendo este ajuste feito *online* pelo fornecedor do aparelho podendo não estar adequado à gama de trabalho validade para o método.

Desde modo, não foi possível efetuar avanços relativamente à utilização deste novo equipamento, que se espera vir a substituir o anterior, uma vez que a gama de calibração parece ser diferente.



Figura 8.6 - Novo equipamento, Lovibond

IX - Conclusão

Este estudo começou por avaliar e comparar quatro métodos de quantificação de clorofila em óleos vegetais, dentre os quais se encontra o método atualmente usado pela empresa. Perante os resultados obtidos, pode concluir-se que o método usado pela Sovena no período do estudo efectuado apresenta valores próximos ao valor real, ou seja, presente na solução-padrão.

Procedeu-se de seguida à validação estatística do método utilizado na empresa. A espectroscopia UV/VIS demonstrou ser uma técnica de rápida execução, confiável e sem custos elevados para a quantificação e deteção de clorofila em óleos vegetais. Revelou-se um método de análise bastante preciso e com uma boa exatidão na gama de trabalho escolhida de 0 – 40ppm, se o ajuste for executado de forma satisfatória. Esta técnica apresenta também limites de deteção e quantificação baixos podendo detetar quantidades de clorofila muito reduzida, na ordem dos 30ppb.

Por fim, após estudo da refinação química em óleos vegetais e tendo em foco a etapa de branqueamento, esta foi reproduzida em laboratório, procedendo-se a ensaios com o intuito de otimizar diversos parâmetros que influenciam a remoção de clorofila. Os parâmetros estudados foram os seguintes: Temperatura de trabalho, Tempo de Contacto, Quantidade de Terras de Branqueamento, Variação da percentagem de caudal secundário para adição de terras e Variação da temperatura de caudal secundário para adição de terras.

Dos ensaios realizados, verificou-se que à medida que se aumenta a temperatura de trabalho ou a quantidade de terras introduzidas existe um decréscimo considerável da concentração de clorofila no óleo branqueado. Para além disso, o aumento do tempo de contacto reduz de forma considerável a concentração de clorofila no óleo branqueado não apresentando patamar de saturação nestes ensaios executados até uma hora de tempo de contato. Relativamente à quantidade de óleo removido do caudal principal, a que foi dado o nome de caudal de hidratação, a sua variação em termos de quantidade não pareceu influenciar a remoção de clorofila. Os ensaios relativos aos ensaios de alteração de temperatura do mesmo foram inconclusivos.

Apesar de tudo o que foi realizado neste estudo, a etapa de branqueamento foi estudada como uma etapa isolada quando, na realidade, sofre uma elevada influência das etapas anteriores, mais especificamente da desgomagem, da neutralização e, não menos importante, da centrifugação dos sabões e gomas. Um futuro estudo que seria útil realizar seria o de como parâmetros das etapas anteriormente referidas iriam afetar de forma negativa a remoção da clorofila, direta ou indiretamente, na etapa de branqueamento. Para além disso, poderia ser interessante confirmar a existência de um patamar de saturação das terras, ou ainda, investigar a existência de novas terras de branqueamento e a sua influência na remoção de clorofila, devido ao rápido avanço tecnológico e científico em diversas áreas da ciência.

X - Bibliografia

- Alfa Laval. (2004). Alfa Laval bleaching processes for fats and oils.
- Amfilter Group. (2008, Novembro 18). Pratical Short Course: Advanced Edible Oil Refining and Processing. Munique.
- Andreson, D. (2005). A Primer on Oils Processing Technology. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*.
- Anónimo. (2013). *Extraction and Characterization of Vegetable Oil Using Breadfruit Seed*. Caritas University.
- Anónimo. (2014, Agosto 30). *Fundamentos e Principios Físico-Químicos*. Retrieved from Portal Laboratórios Virtuais de Processos Químicos:
http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=450&id=188&option=com_content&task=view#1
- Batinas, V. L. (2006). Eliminação da Clorofila no Branqueamento do óleo de Soja. Beja.
- Belter, P. A., Cussler, E. L., & Hu, W. S. (1988). Adsorption. In P. A. Belter, E. L. Cussler, & W.-S. Hu, *Bioseparations - Downstream Processing for Biotechnology* (pp. 145 - 177). New York: Jonh Wiley and Sons.
- Biochrom. (2014, Setembro 10). *Basic UV/VIS Spectrophotometry*. Retrieved from BioChrom:
www.biochrom.co.uk/download/72/
- Castro, A. F. (2000). *Guia RELACRE 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*.
- Chasin, A. A., Nascimento, E. d., Ribeiro-Neto, L. M., Siqueira, M. E., Andraus, M. H., Salvadori, M. C., . . . Salcedo, S. (1998). Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 11(1), 1-6.
- Christenson, R. L. (1983). *Desgomagem e Refinação Caústica*. Minneapolis: TAGOL.
- Doran, P. M. (1996). *Bioprocess Engineering Principles*. London: Harcourt Brace & Company.
- Erickson, D. R., Pryde, E. H., Brekke, O. L., Mounts, T. L., & Falb, R. A. (1980). *Handbook of Soy Oil Processing and Utilisation*. AOCS and American Soybean Association.
- FEDIOL. (2014, Agosto 20). *FEDIOL*. Retrieved from FEDIOL/About our Products:
<http://www.fediol.eu/web/chemical%20refining/1011306087/list1187970119/f1.html>
- Ferreira, A. (2013, Março 26). Introdução à Validação de Métodos Analíticos.
- Hammond, E. G., Johnson, L. A., Su, C., Wang, T., & White, P. J. (2005). Soybean Oil. In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (Vol. 2).
- Karasulu, H. Y., Karasulu, E., Büyükhelvacigil, M., Yildiz, M., Ustün, Z., Büyükhelvacigil, K., & Gazel, N. (2011). Soybean Oil: Production Process, Benefits and Uses in Pharmaceutical Dosage Form. In P. H. El-Shemy (Ed.), *Soybean and Health*. doi:10.5772/18710

- Kaynak, G., Ersoz, M., & Kara, H. (2004). Investigation of the properties of oil at the bleaching unit of an oil refinery. *Journal of Colloid and Interface Science*, 131 - 138.
- Kumar, S. (2006). *Organic Chemistry - Spectroscopy of Organic Compounds*. Amritsar.
- O'Brien, R. D. (2009). *FATS and OILS - Formulating and Processing for Applications* (3rd ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Oliveira, S. d. (2012, Novembro 2012). *Estudo das Unidades de Desgomagem e Neutralização*.
- P. Eshratbadi, M. S.-Z. (2008). Enhanced Degumming of Soybean Oil and its Influences on Degummed Oil And Lecithin. *Iranian Journal of Chemical Engineering Vol. 5 Mo. 1*.
- Patricio, J. S., Hotza, D., & De Noni Júnior, A. (2014). Argilas adsorventes aplicadas à clarificação de óleos vegetais. *Cerâmica*, 60(354), 171 - 178.
- Patterson, H. B. (2009). *Bleaching and Purifying Fats and Oils*. AOCS Press.
- Przybylski, D. R. (2014, Agosto 20). *Canola Oil: Physical and Chemical Properties*. Retrieved from Canola Council:
http://fr.canolacouncil.org/media/515239/canola_oil_physical_chemical_properties_1.pdf
- Reis, P. B. (2006). Validação de Método Espectrofotométrico para determinação de nitrito em patê de presunto.
- Ribeiro, C. M. (2006). Estabelecimento de uma rotina laboratorial para análise química de sedimentos e sua aplicação a sedimentos continentais do Minho (NW Portugal) : contribuição para a reconstituição paleoambiental da região.
- Santos, S. M. (2012). Reconversão de uma Unidade de Pré-tratamento de Óleo para Biodiesel. Aveiro.
- Separações e Operações Unitárias*. (2014, Agosto 22). Retrieved from Portal de Engenharia Química:
http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=450&id=188&option=com_content&task=view#1
- Statista. (n.d.). Retrieved Agosto 20, 2014, from Statista:
<http://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption>
- Steer, J. (2014, Agosto 30). *Structure and Reaction of Chlorophyll*. Retrieved from
<http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/steer/chloro.htm>
- Streit, N. M., Canterle, L. P., Canto, M. W., & Hecktheuer, L. H. (2005). The Chlorophylls. *Ciência Rural*, 35(3).
- Tecnologias, C. I. (2014, Agosto 20). *Download*. Retrieved from Crown Iron Tecnologias - Oil Extraction Expert: <http://www.crowniron.com.br/wp-content/themes/tweetmeblue/catalogos/05-refino/01-refino-de-oleos.pdf>
- Thurman, B. H. (1932, October). Characteristics of Colors in Vegetable Oils and Methods of Removal. *Industrial & Engineering Chemistry*, 24(10), 1187-1190.
- USDA. (2014, Agosto). *Oilseeds: World Markets and Trade*.

- Zeldenrust, R. S. (2014, Agosto 20). *Edible Oil Processing - Alkali Refining*. Retrieved from The AOCS lipid library: <http://lipidlibrary.aocs.org/processing/alkrefining/index.htm>
- Zufarov, O., Schmidt, S., & Sekretár, S. (2008). Degumming of Rapeseed and Sunflower Oils. *Acta Chimica Slovaca*, 1(1), 321-328.

XI - Anexos

Anexo 1

SAMPLING AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS AND OILS

AOCS Official Method Cc 13d-55

Reapproved 1997 • Revised 1999

Chlorophyll Pigments

DEFINITION

This method is used to determine mg/kg (ppm) of chlorophyll-related pigments (predominantly pheophytin a) in oils from spectrophotometric absorption measurements at 630, 670 and 710 nm (see Notes, 1).

SCOPE

Applicable to expelled, refined and bleached oils. This method is not applicable to hydrogenated oils, deodorized oils and finished products, because in these processed oils, the absorption maximum does not occur at 670 nm (see Notes, 2 and 3).

APPARATUS

1. Spectrophotometer.
2. Cuvettes—50 mm long, 20 mm wide and 40 mm deep. These cuvettes must be matched and differ from each other by not more than 0.5% transmittance when checked with distilled water at 400 nm. Any suitable matched cuvettes with 50-mm light path may be used. Cuvettes with shorter light path, carefully matched, should be available for oils with an absorbance >0.8 at the wavelengths used.

REAGENTS

1. Methylene chloride (CH_2Cl_2) or methylisobutylketone (MIBK)—reagent grade (see Notes, *Caution*). The transmittance should not differ from that of distilled water by more than 0.5% at 400 nm.

ADJUSTMENT OF SPECTROPHOTOMETER

1. Before using, the spectrophotometer should be checked carefully following the instructions given in the operating manual obtained with the instrument. The wavelength setting of the instrument should be checked with the blue sensitive phototube in the instrument. With the instrument turned on and with no cuvettes in the cuvette compartment, the maximum sensitivity obtainable with the instrument should occur at approximately 540 nm. It is advisable to check the instrument occasionally against a mercury vapor lamp using 579.1, 546.1, 435.8 and 404.7 nm as check points. Any mercury vapor lamp can be focused to pass through the instrument in place of the regular incandescent lamp normally used. Transmission peaks should occur at the specified wavelengths.

PROCEDURE

1. Turn on the spectrophotometer.
2. Place a 50-mm cuvette containing the CH_2Cl_2 or MIBK in the cuvette compartment. Zero the instrument.
3. Adjust the temperature of the oil to $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The oil sample must be clear and free of moisture, haze and particulate matter. Fill a second 50-mm cuvette with the oil sample and place in the cuvette compartment of the spectrophotometer.
4. Measure the absorption of the oil sample. Adjust the wavelength setting to the next desired wavelength with either CH_2Cl_2 or MIBK in the light path. Adjust the instrument to give a zero reading. Place the sample in

the light path and measure the absorbance. Make all desired readings following this procedure.

5. All absorbance values should preferably fall between 0.3 and 0.8. Use the maximum cuvette size to give the desired values. On bleached oils, absorbencies of less than 0.3 will be obtained.

CALCULATIONS

1. Concentration of chlorophyll pigments—

$$\text{mg/kg (ppm) } C = \frac{A_{670} - (A_{630} + A_{710})/2}{F \times L}$$

Where—

C = chlorophyll pigments

A = absorbance

L = cuvette length, cm

F = factor specific to each spectrophotometer (see Notes, 3)

NOTES

Caution

Methylene chloride is toxic and a carcinogen. The TLC is 100 ppm in air. A fume hood should be used at all times when using methylene chloride.

NUMBERED NOTES

1. This method is not directly applicable to processed and heated oils, because in such oils part or all of the chlorophyll-related pigments may be converted to products that do not exhibit an absorbance maximum at 670 nm.
2. Several variations of this method have been proposed; they include the following:
 - (a) Treatment with acetic acid (to convert any remaining chlorophyll to pheophytin), and determining the total pheophytin content, to yield more accurate results. (The pheophytin content is related to the original chlorophyll content.)
 - (b) Individually determine chlorophyll and pheophytin by HPLC, using appropriate chlorophyll and pheophytin standards.
 - (c) Determine the actual absorbance maximum of the sample and substitute this value in the equation used in the calculation for mg/kg (ppm) chlorophyll.
 - (d) Determine the chlorophyll pigments spectrophotometrically as pheophytin a as follows (References, 1 and 2):

SAMPLING AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS AND OILS
Cc 13d-55 • Chlorophyll Pigments

$$C = \frac{345.3 \times (A_{670} - 0.5 \times A_{630} - 0.5 \times A_{710})}{L}$$

Where—

C = concentration of pigments in mg/kg (ppm) oil

A = absorbance at respective wavelengths

L = thickness of spectrophotometer cuvette

3. Factors may be determined for spectrophotometer models currently available, using chlorophyll standards. However, due to the instability of chlorophyll, if this approach is taken, the analyst is advised to check the composition of the chlorophyll standards by an appropriate method, e.g., HPLC. The true composition

of the standards as so determined may then be used to calibrate the spectrophotometer.

REFERENCES

1. *La Revista Italiana delle Sostanze Grasse* 67:521 (1990).
2. IUPAC Commission on Oils and Fats, Working Report, International Union of Pure and Applied Chemistry, July 9, 1990, p. M-10.

OTHER REFERENCES

- Fette, Seifen, Anstrichm.* 86 (8):304 (1984).
J. Am. Oil Chem. Soc. 62 (1):113 (1985).
Rev. Fr. Corps Gras 32 (6-7):257 (1985).

Anexo 2

SAMPLING AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS AND OILS

AOCS Official Method Cc 13i-96

Reapproved 1997 • Revised 2001

Determination of Chlorophyll Pigments in Crude Vegetable Oils

DEFINITION

The content of chlorophyll pigments in vegetable oils is expressed as mg of pheophytin a in 1 kg of oil.

SCOPE

This method determines total chlorophyll pigments, expressed as pheophytin a, in crude vegetable oils. The method is suitable for the determination of quantities of chlorophyll pigments higher than 1 mg/kg (1 ppm). The chlorophyll pigments are determined by measuring the absorbance at 670 nm, correcting the result for the background absorption, and calculating the content with the use of the absorptivity of pheophytin a, which is the main chlorophyll pigment in crude vegetable oils.

APPARATUS

1. Spectrophotometer allowing the measurement in the range of 630–710 nm.
2. Glass spectrophotometer cells, with light path of 5 mm and 10 mm.
3. Glass funnel—diameter 40–60 mm.

PROCEDURE

1. The sample is heated to a temperature no more than 5°C higher than the melting point of the sample, if the sample is solid at room temperature. The liquid sample is mixed thoroughly, and if it is turbid, it is filtered immediately prior to the analysis, using a filter paper of medium porosity.
2. The sample is measured at 630 nm, 670 nm and 710 nm in a 5-mm or 10-mm spectrophotometer cell (Apparatus, 2) against air rather than a reference cell.

CALCULATION OF RESULTS

1. The content of chlorophyll pigments is expressed in mg of pheophytin a, which is calculated as follows:

$$C = 345.3 \times \frac{(A_{670} - 0.5 \times A_{630} - 0.5 \times A_{710})}{L}$$

Where—

C = content of chlorophyll pigments as mg of pheophytin a in 1 kg of oil

A = absorbance at the respective wavelength (nm)

L = light path of the spectrophotometer cell (mm)

PRECISION

1. Repeatability, expressed by the coefficient of variation, RSD_r, is—0.4 at high concentration of chlorophyll pigments; 1.0 at moderate concentration of chlorophyll pigments; and 1.4 at low concentration of chlorophyll pigments. See Tables 1–3.
2. Reproducibility, expressed by the coefficient of variation, RSD_R, is—1.3 at high concentration of chlorophyll pigments; 3.5 at moderate concentration of chlorophyll pigments; and 6.0 at low concentration of chlorophyll pigments. (See Tables 1–3.)

REFERENCE

1. Results of the IUPAC Commission on Oils, Fats and Derivatives collaborative study for the determination of chlorophyll pigments in crude vegetable oils, *Pure & Applied Chemistry* 67(10):1781 (1995).

Table 1

Results of a 1990 collaborative study on the determination of chlorophyll pigments in rapeseed oil.

Sample	1	2	3	4	5	6
Total number of laboratories accepted	12	12	12	12	12	12
Mean of the laboratory values (mg/kg)	34.54	11.30	4.02	33.95	15.37	5.88
Repeatability						
Standard deviation, s_r	2.24	2.99	0.90	1.27	1.14	0.97
Relative standard deviation, RSD _r , %	6.49	26.45	22.29	3.75	7.43	16.46
Repeatability value, $2.8 \times s_r$	6.34	8.46	2.54	3.60	3.23	2.74
Reproducibility						
Standard deviation, s_R	3.39	4.02	1.78	3.09	2.47	1.66
Relative standard deviation, RSD _R , %	9.81	35.57	44.20	9.40	16.06	28.33
Reproducibility value, $2.8 \times s_R$	9.58	11.38	5.03	9.03	6.99	4.71

SAMPLING AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS AND OILS

Cc 13i-96 • Determination of Chlorophyll Pigments in Crude Vegetable Oil

Table 2

Results of a 1991 collaborative study on the determination of chlorophyll pigments in rapeseed oil.

Sample	1	2	3	4	5	6
Total number of laboratories accepted	10	10	7	7	10	9
Mean of the laboratory values (mg/kg)	46.56	51.23	0.20	0.32	17.01	20.93
Repeatability						
Standard deviation, s_r	0.38	0.25	0.01	0.03	0.72	0.21
Relative standard deviation, $RSD_r\%$	0.82	0.49	5.04	9.72	4.26	0.98
Repeatability value, $2.8 \times s_r$	1.09	0.72	0.03	0.09	2.05	0.58
Reproducibility						
Standard deviation, s_R	4.01	4.02	0.11	0.13	2.29	0.63
Relative standard deviation, $RSD_R\%$	8.62	7.84	57.69	40.73	13.47	3.01
Reproducibility value, $2.8 \times s_R$	11.36	11.37	0.32	0.13	6.48	1.78

Table 3

Results of a 1992 collaborative study on the determination of chlorophyll pigments in vegetable oil.

Sample	1	2	3	4	5	6
Total number of laboratories accepted	12	12	12	11	11	12
Mean of the laboratory values (mg/kg)	54.49	52.39	28.15	25.40	7.28	6.71
Repeatability						
Standard deviation, s_r	0.23	0.10	0.11	0.06	0.06	0.07
Relative standard deviation, $RSD_r\%$	0.66	0.29	0.31	0.18	0.17	0.19
Repeatability value, $2.8 \times s_r$	0.43	0.20	0.39	0.25	0.84	1.00
Reproducibility						
Standard deviation, s_R	0.85	0.69	0.50	1.93	0.28	0.18
Relative standard deviation, $RSD_R\%$	2.39	1.42	1.42	5.40	0.80	0.51
Reproducibility value, $2.8 \times s_R$	1.55	1.31	1.78	7.60	3.90	2.71

Anexo 3

744-12 740 1007 SEP 1985 1000

P. 3 4

ANALYTICAL PROCEDURES

BFM 0a-8

Method: Pheophytin (Chlorophyll)

DEFINITION

This method is used to determine the micrograms per liter of pheophytin in vegetable oils from spectrophotometric absorbance measurements.

SCOPE

Applicable to crude, refined, and bleached domestic vegetable oils. For deodorized oils, see Note 1.

(A) Apparatus

1. Recording Spectrophotometer, Beckman Model DU-7 or equivalent
2. Beckman Absorption Cells, 1 cm and 5 cm length

(B) Reagents

1. Methylene Chloride, spectrophotometric grade
2. Chlorophyll A, Sigma Chemical Co.
3. Glacial Acetic Acid, Bakers

(C) ProcedurePreparation of Pheophytin A Calibration Standards and Absorptivity Determination

1. Prepare approximately 10,000 ppb stock solution of pheophytin A by weighing 1.0 mg of pure chlorophyll A crystals into a 100 ml volumetric flask.
2. Fill the flask halfway with spectrometric grade methylene chloride, then add 1.0 ml of glacial acetic acid. Allow the reaction to occur for 2 minutes, with gentle mixing, and fill to volume with methylene chloride.
3. Prepare five different concentrations of pheophytin A standards from the stock solution and obtain absorbance readings of each one at three wavelengths: 630, 670, and 710 nm. Methylene chloride is used as a blank.
4. Calculate the absorptivity or extinction coefficient of each pheophytin A standard using the formula in section E.1.
5. Plot a calibration curve, Pheophytin A Conc. (ppb) vs. Absorbance, and determine the linearity.

CONTINUED

Issued: 9-1-66
Revised: 3-15-77, 8-2-84, 1-8-85
Issued to:

BFM 0a-8

3A-21

3A-22 100 BEST PRACTICES
ANALYTICAL PROCEDURES

- 2 -

P.F. 4

Continued from previous page

(D) Sample Analysis

1. Using the proper absorption cells (see Note 2), determine the absorbance of the sample (diluted if necessary) on the spectrophotometer at wavelengths of 630, 662, 668, 670, 672, and 710 nanometers. Methylene chloride is used as a blank. Use the formula in section E.2.

(E) Calculations

1. Calculation of Absorptivity or Extinction Coefficient

$$\text{Corrected Absorption} = A_{670} - \frac{A_{630} + A_{710}}{2}$$

$$\text{Absorptivity} = \frac{\text{Corrected Absorption} \times 1000}{\text{Concentration of Analyte (ppb)} \times \text{cell length in cm.}}$$

2. Calculation of Crude, Alkali Refined and Bleached Oils

Call the reading at 630 nm - A

Call the highest of the readings at 662, 668, 670, and 672 nm - B

Call the reading at 710 nm - C

$$\text{Corrected Absorbance} = B - \frac{A + C}{2}$$

Pheophytin, micrograms/liter (ppb) =

$$\frac{\text{Corrected Absorbance} \times 1000}{\text{Cell length in cms.} \times \text{Dilution Factor} \times 0.04074 (\text{Absorptivity})}$$

$$\text{Dilution Factor} = \frac{\text{Grams of Oil}}{\text{Grams of Oil} + \text{Grams of Solvent}}$$

3. Calculation of Deodorized Oils

Call the reading at 600 nm = D

Call the highest of the readings at 640, 645, 650, and 655 nm = E

Call the reading at 700 nm = F

$$\text{Corrected Absorbance} = E - \frac{D + F}{2}$$

CONTINUED

Issued: 9-1-66

Revised: 3-15-77, 8-2-84, 1-8-85

Issued to:

3A-22

ANALYTICAL PROCEDURES

- 3 -

BFM

Continued from previous page(E) Calculations (Cont'd)3. Calculation of Deodorized Oils

Apparent Pheophytin ug/l =

$$\frac{\text{Corrected Absorbance} \times 1000}{\text{Cell length in cms.} \times \text{Dilution Factor} \times 0.04074}$$

(F) Precision

0,10595

The standard deviation of the method using the absorptivity of .04074 for sample 12038-31-g is ± 1.3 .

(G) Notes

1. When applying the method to deodorized oils, the material being measured is pheophytin plus a combination of degradation products; therefore, the value obtained is apparent only. Take readings of the peak at 640, 645, 650, and 655 nm (maximum=D), and 700 nm (minimum=E) value. Calculate by using the formula in section E.3.
2. The 1.0 cm cells are used for crude oils. The 5 cm cells are usually satisfactory for refined and bleached oils.
3. Unless an unusually high pheophytin content is present, it is not necessary to dilute the sample prior to spectrophotometric analysis and the dilution factor will then be 1.0. If dilution is necessary, methylene chloride is used as the solvent.
4. If a spectrophotometer other than the Beckman DU is used, or new lamps have been installed, evaluate five different samples of different pheophytin concentrations in duplicate, and submit the samples as well as the results to the Best Foods Research Center so that a proper factor can be developed for use with that instrument.

REFERENCES

- 1) M. Merciadet, Research Notebook No. 1203B pp. 13-37.

Issued: 9-1-67
 Revised: 3-15
 Issued to:
 24A-30

H-85

BFM 0a-8

Anexo 4

Tabela 11.1 - Resultados do Método Cc 13i-96 de cada ensaio

Valor Esperado (ppb)	1º Ensaio	2º Ensaio	3º Ensaio
	Clorofila (ppb)	Clorofila (ppb)	Clorofila (ppb)
10	0	0	0
50	34	40	60
100	50	100	150
500	750	790	790
1000	1610	1620	1650
1500	2350	2400	2500
2000	3160	3190	3290
3000	4820	4850	4780
4000	7250	6370	6500
5000	8010	8080	8130
10000	15970	16280	16100

Anexo 5

Tabela 11.2 - Resultados do Método BFM 0a-8 para cada um dos Ensaio

Valor Esperado	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média dos 3 Ensaio
Clorofila (ppb)	Clorofila (ppb)	Clorofila (ppb)	Clorofila (ppb)	Clorofila (ppb)
10	0	12	0	4
50	24	24	49	32
100	417	73	135	104
500	589	589	613	597
1000	1190	1178	1227	1198
1500	1767	1779	1877	1808
2000	2368	2368	2466	2401
3000	3571	3620	3571	3587
4000	5375	4725	4823	4974
5000	5940	5989	6026	5985
10000	11843	12088	11966	11966

Anexo 6

Tabela 11.3 - Resultados do Método utilizado na Sovena, para cada um dos Ensaios

Valor Esperado	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
10	0	9	0
50	18	18	36
100	311	55	100
500	440	440	458
1000	889	880	917
1500	1320	1329	1403
2000	1770	1769	1843
3000	2668	2705	2668
4000	4016	3530	3604
5000	4438	4475	4502
10000	8850	9033	8941

Anexo 7

Tabela 11.4- Dados Clorofila para obtenção do gráfico "Linearidade"

Clorofila Padrão (ppb)	Clorofila Observada (ppb)
250	326
500	599
1000	1201
2500	2941
5000	2856
10000	11616
20000	22821
40000	41485